

Universitäts-Kinderkliniken Zürich
Medizinische Klinik
Direktor: Prof. Dr. med. F. H. Sennhauser

Arbeit unter der Leitung von Prof. Dr. sc. nat. B. Schäfer und Prof. Dr. med. F. Niggli

Neue Translokation t(11;11)(q23;q13) bei akuter myeloischer Leukämie: Suche nach einem unbekannten Partner-Gen

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät
der Universität Zürich

vorgelegt von
Dominique Gilbert Basil Eberle
von Nürensdorf ZH

Genehmigt auf Antrag von Prof. Dr. med. F. H. Sennhauser
Zürich 2009

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	3
2. Abkürzungen	5
3. Einleitung	6
4. Material und Methoden	13
5. Resultate	23
6. Diskussion	33
7. Literaturverzeichnis	35
8. Verdankungen	38
9. Curriculum vitae	39

1. Zusammenfassung

Hintergrund:

Leukämien sind eine heterogene Gruppe maligner Erkrankungen und bei Kindern die häufigste Ursache von Malignomen. In der Pädiatrie kommen überwiegend die akute lymphatische Leukämie (ALL) und etwas weniger häufig die akute myeloische Leukämie (AML) vor. Die Therapien erfolgen im Rahmen standardisierter Therapieschemen und erreichen bei der ALL gut 80%, bei der AML hingegen lediglich 50-60% Dauerheilungsraten.

Chromosomale Veränderungen spielen in der Entstehung von Tumoren nach heutiger Kenntnis eine entscheidende Rolle. Ein relativ häufig veränderter chromosomaler Abschnitt bei Leukämien ist die Region 11q23. Davon entfallen rund 95% der 11q23 Rearrangements in Leukämien auf das MLL (mixed-lineage-leukemia oder myeloid-lymphoblastic-leukemia) Gen. Dieses Gen weist konservierte Regionen auf, welche dem Gen Trithorax (trx) von *Drosophila melanogaster* ähnlich sind. Das MLL Protein scheint in der Embryogenese eine wichtige Rolle zu spielen, indem es die Aktivierung seiner Zielgene, bestimmter Homeobox Gene, aufrechterhält. Es wird vermutet, dass das MLL Protein wichtige Ereignisse bei der Differenzierung der frühen Vorläuferzellen in der Hämatopoese beeinflusst. Bei Rearrangements des MLL-Gens in Leukämien wurden über 60 verschiedene Fusionspartner gefunden, welche auf verschiedenen Chromosomen liegen und eine heterogene Gruppe darstellen. Das Fusionsprodukt besteht jeweils aus einem N-terminalen Anteil des MLL-Gens und einem C-terminalen Anteil des Partners. Chromosomale Rearrangements des MLL-Gens wird gehäuft bei aggressiven de novo Leukämieformen gefunden, kann aber auch typischerweise bei sekundären Leukämieformen auftreten.

Fragestellung:

Die Patientin, welche dieser Studie zu Grunde liegt, wurde Ende Dezember 2000 als AML (FAB M2) mit einer Variante der Translokation t(8;21) in den Leukämiezellen diagnostiziert. Unter der Chemotherapie kam es zu einer Vollremission. Bei einer routinemässigen morphologischen und zytogenetischen Untersuchung des Knochenmarks in der Erhaltungstherapie 15 Monate nach Diagnosestellung wurde ein neuer Klon gefunden, welcher zu einer Veränderung der chromosomalen Region 11q führte. Die initiale Chromosomenveränderung war nicht mehr vorhanden. Man vermutete am ehesten eine Translokation t(11;11)(q13;q23). Diese neue Veränderung führte zur Hypothese, einen neuen unbekannten Fusionspartner für das MLL-Gen auf Chromosom 11q23 entdeckt zu haben.

Methodik:

Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) und verschiedene molekulargenetische Techniken wurden angewendet, um den vermuteten unbekannten Fusionspartner des MLL-Gens zu identifizieren.

Resultate:

Mittels FISH konnte ein Rearrangement des MLL-Gens im Bereiche 11q23 bestätigt werden. Zur Bestätigung der Hypothese wurde bei der Suche nach dem Partnergen von MLL das Panhandle PCR angewandt, eine Technik, die dafür geeignet ist, genomische DNA mit bekanntem 5' Ende und unbekanntem 3' Ende zu amplifizieren. Weiter wurde die RACE Technik gebraucht, mit der von der RNA Ebene ausgehend cDNA revers transkribiert wird mit anschließender Amplifikation und ebenfalls eine übliche Technik bei der Suche nach unbekanntem 3' Ende darstellt. Die Techniken wurden ergänzt durch Nested PCR, versetzte Primer auf der MLL Sequenz sowie Subklonierung. Bei den Sequenzierungen der potentiell in Frage kommenden Banden wurde aber jeweils nur MLL abgelesen, ein Partnergen konnte mit diesen Techniken nicht identifiziert werden. Mittels FISH-Technik gelang es, die genaue Bruchpunktregion für den Partner des MLL-Gens genauer einzugrenzen. Die exakte Identifizierung des Partnergens im Bereiche 11q13 konnte schlussendlich aber nur mit einer Spezialtechnik eines auswärtigen Labors ermittelt werden. Damit wurde es möglich, die Hypothese, eines neuen, bisher nicht beschriebenen Partnergens auf 11q13 für das bekannte MLL-Gen endgültig zu bestätigen.

Schlussfolgerungen:

Bei dieser Patientin mit AML trat im Knochenmark während der Remissionsphase unter Chemotherapie erstmals eine neue klonale Veränderung mit einer Translokation t(11;11)(q13;q23) auf. Dabei kam es zu einer bisher nicht bekannten Fusion des MLL-Gens auf der Chromosomenregion 11q23 mit einem Partnergen auf 11q13. Trotz dieser persistierenden klonalen Chromosomenveränderung befindet sich die Patientin auch 4 Jahre nach Diagnosestellung in bestem klinischem Zustand und morphologisch zeigt sich im Knochenmark eine Vollremission. Die Bedeutung der gefundenen Translokation ist zurzeit noch unklar. Es besteht die Vermutung, dass die Translokation t(11;11)(q13;q23) kein funktionelles Produkt exprimiert und daher für die Patientin nicht von Bedeutung ist. Dennoch kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass diese Veränderung eine frühe chromosomale Veränderung darstellt, aus der eines Tages eine Sekundärleukämie entstehen könnte.

2. Abkürzungen

ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
AML - BFM - 98	AML - Berlin - Frankfurt - Münster 98: Therapiestudie der AML-BFM Gruppe
BAC's	Bacterial artificial chromosomes, künstliche Bakterienchromosome
BCR	breakpoint cluster region, Bruchpunktregion in der MLL Sequenz
bp	Basenpaare
DMSO	Dimethylsulfoxid
cDNA	komplementäre DNA
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FAB	„French-American-British“, Klassifizierungsmethode der akuten lymphatischen und myeloischen Leukämie
FBS	Fötales Kälber Serum
FISH	Fluorescence In Situ Hybridisation
LB	Luria-Bertani-Medium
MLL	mixed-lineage-leukemia oder myeloid-lymphoblastic-leukemia; Gen auf Chromosomenloкус 11q23
mRNA	messenger RNA
PBS	phosphate buffered saline; Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
RACE	Rapid amplification of cDNA ends; schnelle Amplifikation von cDNA-Enden
RNA	Ribonukleinsäure
RT - PCR	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
t-AML	Therapieinduzierte (sekundäre) - AML
Tm	Melting Temperatur; Schmelztemperatur

3. Einleitung

Leukämien

Leukämien sind eine Gruppe heterogener maligner Erkrankungen des hämatopoetischen Systems, welche durch eine unkontrollierte klonale Proliferation hämatopoetischer Vorläuferzellen verursacht werden. Leukämien machen rund einen Drittel aller Malignome im Kindesalter aus und haben eine Inzidenz von ungefähr 5 auf 100.000 Kinder [1]. Abhängig von der Ursprungszelle werden die Leukämien in lymphatische und myeloische Leukämien unterteilt, wobei Lymphoblasten die Vorläuferzellen von B- und T-Lymphozyten und Myeloblasten die Vorläuferzellen der Granulozyten sind, zu sehen anhand der Hämatopoese in Abbildung 1. Weiter können die Leukämien nach ihrem Krankheitsverlauf in akut oder chronisch eingeteilt werden.

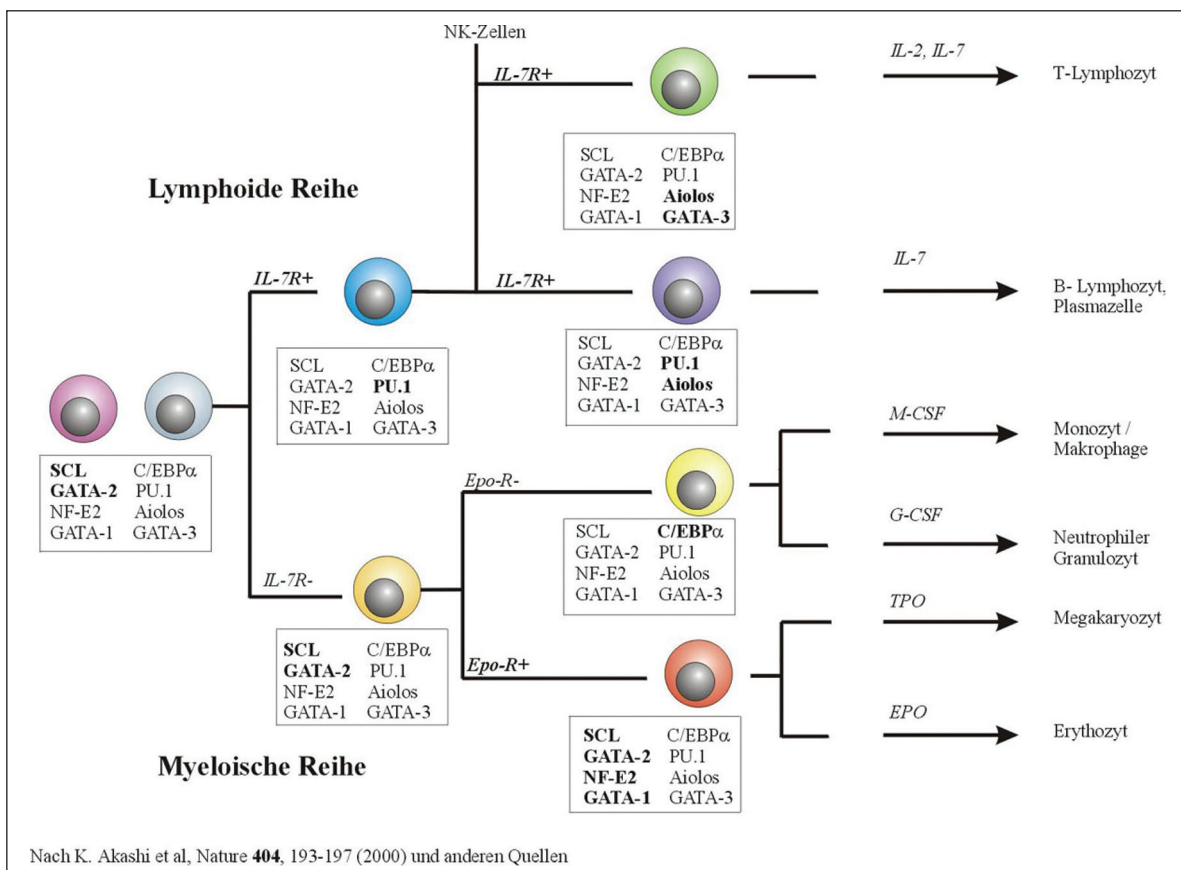


Abb.1 Schematische Darstellung der Hämatopoese ausgehend von der hämatopoetischen Stammzelle. Gut zu sehen ist die Aufteilung in die lymphoide und myeloische Zelllinie, welche zur lymphatischen beziehungsweise zur myeloischen Leukämie führen. In den Boxen sind die jeweils wichtigen Transkriptionsfaktoren der einzelnen Zelllinien aufgelistet. Im Kursivdruck stehen die zur Differenzierung notwendigen Zytokine zur Stimulation der Zelllinien.

Bei Kindern ist die akute lymphatische Leukämie (ALL) mit etwa 78% die häufigste Leukämieform, während auf die akute myeloische Leukämie (AML) etwa 16% entfallen. Chronische Leukämien bei Kindern sind selten [1]. Durch die Akkumulation der leukämischen

Blasten im Knochenmark wird die normale Hämatopoese verdrängt mit folgender Knochenmarksinsuffizienz. Unbehandelt führen Leukämien schnell zum Tode.

Die Behandlung der Leukämien erfolgt im Rahmen von prospektiven multizentrischen Therapiestudien. Am meisten verbreitet sind die Therapieprotokolle der BFM-Studiengruppe (aktuell ALL-BFM 2000 Protokoll und AML-BFM 2004 Protokoll). Dabei erfolgt die genaue Subklassifizierung der Leukämien auf Grund der mikroskopischen Morphologie und unter Einschluss von Immunophänotypisierung sowie zytogenetischer oder molekulargenetischer Merkmale der Leukämiezellen. Die Behandlung wird risikoadaptiert mittels zytostatischer Polychemotherapie durchgeführt, die mit weiteren Therapieoptionen wie Bestrahlung oder allogener Knochenmarktransplantation kombiniert werden kann. Ebenfalls wird das initiale Therapieansprechen in die Risikostratifizierung mit einbezogen. Dadurch wird bei ALL eine Dauerheilungsrate von ungefähr 75% bis 80% erreicht, während bei der AML die Dauerheilungsrate zwischen 50% bis 60% liegt [2, 3, 4].

Chromosomale Translokationen

Maligne Erkrankungen sind nach heutiger Kenntnis mit genetischen Veränderungen in den betroffenen Zellen verbunden. Durch den Austausch genetischen Materials im Rahmen von Translokationen zwischen betroffenen Chromosomenregionen kann es zu quantitativen oder qualitativen Störungen der normalen Genexpression kommen. Die Folge kann eine unkontrollierte klonale Proliferation der betroffenen Zellen durch eine Überexpression von Protoonkogenen oder durch die Expression von chimären Fusionsgenen sein. Die betroffenen Proteine sind in beiden Kategorien oft Transkriptionsfaktoren, und der Verlust der Kontrolle über die Transkription spielt eine bedeutende Rolle in der Ätiologie von Malignomen [3, 5].

Chromosomale Translokationen mit Beteiligung der Region 11q23

Sowohl bei AML als auch bei ALL ist ein häufig an Translokationen beteiligter genomischer Bereich die Region 11q23 auf dem langen Arm des Chromosoms 11. Obwohl mehrere verschiedene Gene gefunden wurden, betreffen ungefähr 95% der 11q23 Aberrationen das MLL-Gen (mixed-lineage-leukemia oder myeloid-lymphoblastic-leukemia), auch bezeichnet als ALL1-Gen (acute lymphoblastic leukemia) oder als HRX- oder HTRX-Gen (human-homologue of trithorax) [6, 7, 8, 9].

MLL und 11q23 Aberrationen

Translokationen welche 11q23 betreffen werden in ungefähr 5-10% der ALL und 5% der AML sowie in ungefähr 80% der Säuglingsleukämien (Kinder unter 1 Jahr mit ALL oder auch AML) gefunden [10, 11]. Die Translokationen können de novo entstehen oder aber auch selten therapieinduziert hervorgerufen werden, was zum Beispiel zu sekundären Leukämien bei Patienten führen kann, die im Rahmen der Chemotherapie mit Hemmern des Enzyms Topoisomerase II behandelt wurden. In der Regel sind diese therapieinduzierten sekundären Leukämien akute myeloblastische Leukämien (t-AML), seltener akute lymphoblastische Leukämien (t-ALL). Die häufigsten Translokationen bei der t-AML sind die t(9;11) und die t(11;12) [12, 13].

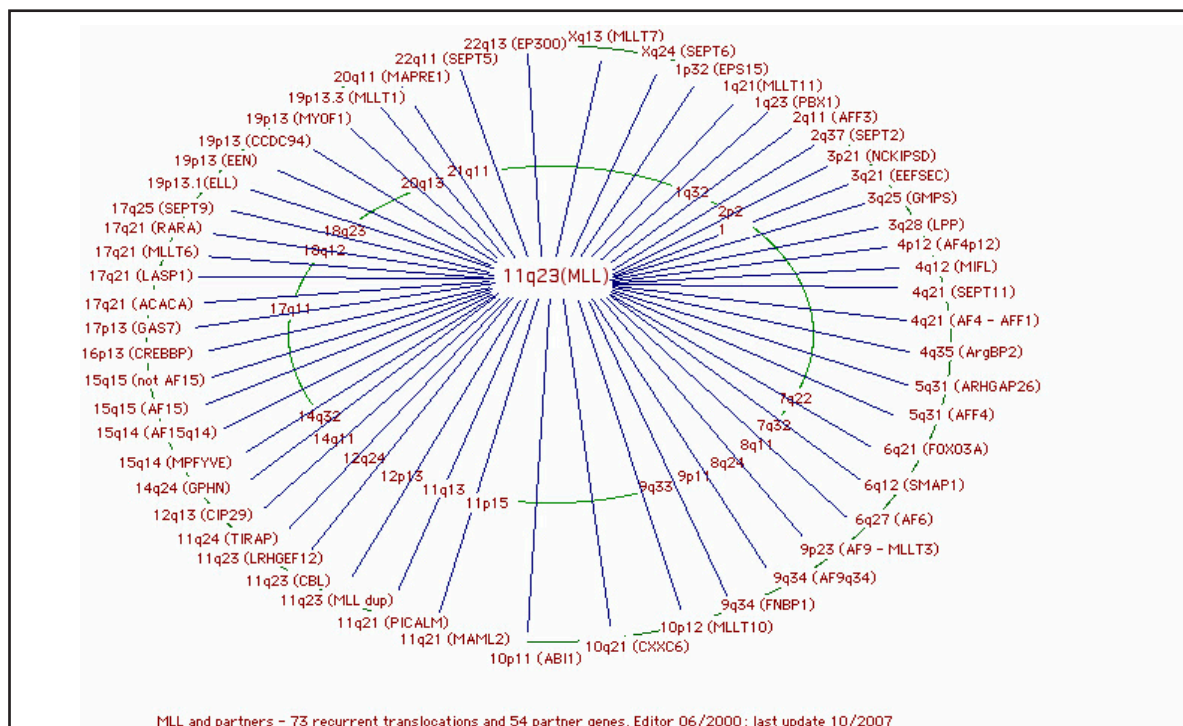


Abb. 2 Schematische Darstellung der verschiedenen MLL Fusionspartnern. Bemerkenswert ist einerseits die hohe Anzahl an verschiedenen Partnern, andererseits die grosse Variabilität bezüglich der Partner. Quelle: <http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer/Anomalies/11q23ID1030.html>

Bemerkenswert für die Translokationen von MLL ist, dass bis heute über 60 verschiedene Fusionspartner für das MLL-Gen auf unterschiedlichen Chromosomen gefunden wurden, was die Abbildung 2 anschaulich illustriert [14, 15]. Viele der MLL Fusionspartner wurden identifiziert und stellen eine heterogene Gruppe von Proteinen dar [16]. MLL Partner können in zwei Klassen eingeteilt werden. Die erste Gruppe ist hauptsächlich cytoplasmatisch und häufig mit zytoskelett-abhängigen Signaltransduktionen assoziiert. Diese Translokationen werden sehr selten gesehen und es sind nur wenige Fälle davon bekannt, obwohl dies die grösste Gruppe bezüglich der Vielfältigkeit darstellt. Die zweite Gruppe repräsentiert die Mehrheit der 11q23 Translokationen: In diesem Fall ist MLL mit Kernproteinen fusioniert, welche Transkriptionsfaktoren ähneln [17].

In der zweiten Gruppe kommen die Translokationen t(4;11)(q21;q23), t(9;11)(p21-22;q23) und t(11;19)(q23;p23.3) am häufigsten vor und führen zu den jeweiligen Fusionsproteinen MLL-AF4, MLL-AF9 und MLL-ENL. Die MLL-AF4 Fusion wird vor allem in ALL gefunden, dominierend bei Kindern, während die MLL-AF9 Fusion hauptsächlich mit AML assoziiert ist, und MLL-ENL sowohl in AML als auch in ALL vorkommt. Die AF4, AF9 und ENL Proteine sind Kernproteine und es wird ihnen eine Rolle in der Regulation der Transkription zugeschrieben [9, 15, 17, 18, 19].

Ebenfalls in der Literatur beschrieben wird die sogenannte Partielle Tandem Duplikation (PTD) von MLL, bei der sich das 5' Ende von MLL mit sich selber fusioniert. Diese Abnormalität ist mit AML assoziiert, die Inzidenz liegt bei 3-10%, ist jedoch deutlich erhöht bei Trisomie des Chromosoms 11 [15, 20].

Das MLL-Gen umspannt die Region 11q23 mit etwa 100 kb. 37 Exons kodieren für ein aus 3969 Aminosäuren bestehendes Protein mit einem Molekulargewicht von 431 Kilodalton, welches Homologien zum Drosophila trithorax Gen hat [10, 21, 22]. Translokationen beim MLL-Gen führen bei allen bekannten 11q23 Translokationen zur Bildung eines chimären Fusionsgens aus einem MLL-Anteil, der sich am 5' Ende befindet, und einem Anteil des jeweiligen Partnergenes, welches sich am 3' Ende befindet. MLL Fusionsproteine bestehen somit aus einem N-terminalen Anteil des MLL Proteins, welches mit einem C-terminalen Anteil eines Partnerproteins gebunden ist [10, 17, 23].

Die Bruchpunkte bei den verschiedenen MLL Translokationen liegen alle innerhalb einer sogenannten Bruchpunkt Cluster Region (BCR = breakpoint cluster region), eine 8.3-kb lange Region zwischen den Exons 5 bis 11 [9, 10, 17, 24, 25].

Das MLL Protein ist ein Kernprotein und es wurden verschiedene funktionelle Domänen von MLL identifiziert. MLL ist im Körper weit exprimiert, wenn nicht sogar ubiquitär vorkommend [26]. Der Vergleich von Sequenzen hat gezeigt, dass MLL Homologien zum Gen der Fruchtfliege Drosophila melanogaster hat, welches für das Protein trithorax (trx) kodiert. In Drosophila wurde nachgewiesen, dass trx während der Embryogenese gebraucht wird und als positiver Regulator wirkt, um die Expression seiner Zielgene zu unterhalten und der Repression durch die Polycomb Gruppen (PcG) Gene entgegenwirkt. Es konnte gezeigt werden, dass MLL wie trx die Klasse 1 Homeobox (Hox) Gene positiv reguliert. Bei Knockout Studien mit Mäusen wurde gesehen, dass homozygoter Verlust von MLL in der Embryogenese letal ist, und den MLL^{-/-} Embryos die Expression von Homeobox Genen fehlt. Ebenfalls gezeigt werden konnte, dass Mäuse, welche heterozygot bezüglich MLL sind, Skelettanomalien aufweisen. Weil Hox Gene in der Regulation der Hämatopoese eine Rolle spielen, zeigen MLL^{-/-} Mäuse einen schweren Defekt der fetalen Blutproduktion in der Leber. In Vitro wiesen die embryonalen Stammzellen bei MLL^{-/-} Mäusen weiters eine beeinträchtigte Differenzierung der Hämatopoese auf, was zum Schluss führt, dass MLL Ereignisse die frühen hämatopoetischen Vorläuferzellen beeinflussten. Bei Knock-in Studien mit Mäusen bezüglich MLL-AF9 wurde die Hypothese aufgeworfen, dass die chromo-

somale Translokation bei MLL zwei Ereignisse zur zellulären Transformation braucht: Haploinsuffizienz und Gewinn an Funktion des MLL Gen durch die Fusion mit einem Partner [15, 16, 23, 27, 28].

Die am höchsten konservierte Sequenz zwischen MLL und *trx* ist die SET (Su(var) 3-9; enhancer of zeste; trithorax) Domäne, von der gedacht wird, dass sie die Genaktivität moduliert. Die SET Domäne geht in MLL Fusionsproteinen verloren und wird durch einen C-terminalen Anteil des Fusionspartner ersetzt. Daraus könnte ein Verlust resultieren, auf Entwicklungssignale zu antworten, welche spezifische Gene unterdrücken. Eine zweite Region von Konservation zwischen MLL und *trx* ist eine Serie von 3 Cystin-reichen Zink Finger Domänen, bekannt als PHD (plant homeodomain), und einem abweichenden Zinkfinger, von denen gedacht wird, dass sie in Protein-Protein Interaktionen eine Rolle spielen. Zwischen dem dritten und vierten Finger liegt eine Region, die mit der Bromodomäne verwandt ist, welche bei gewissen Chromatin-assoziierten Proteine präsent ist. Diese beiden Regionen gehen ebenfalls bei einer Fusion mit einem Partner verloren. Im N-terminalen Drittel befinden sich 3 AT Haken Motive, von welchen beschrieben wird, dass sie an DNA binden und mit der SET Domäne interagieren. Eine zweite DNA bindende Struktur befindet sich ebenfalls auf dem N-terminalen Anteil, eine Cystin-reiche Region welche Homologien zu DNA Methyltransferase hat. Weiter wurden auf dem MLL Protein verschiedene, die Transkription aktivierende oder repressierende Domänen gefunden [15, 17, 23, 24]. Zu sehen sind die beschriebenen Sequenzen beziehungsweise Domänen in der Abbildung 3.

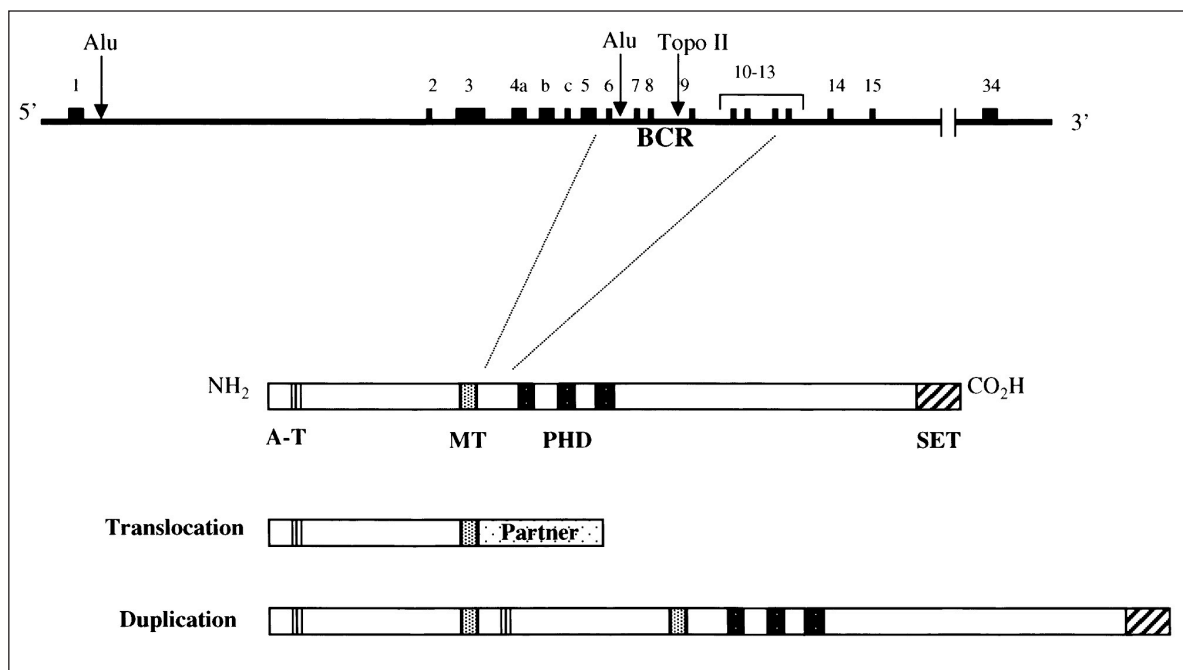


Abb. 3 Illustration des MLL Gens sowie des MLL Proteins. Zu sehen ist zuoberst die Organisation des MLL Gens (Intron / Exon Struktur, BCR), darunter das MLL Protein und Produkte der MLL Rearrangements, sowie die wichtigen Strukturen des MLL Protein. (A-T = AT Haken, MT = Mythyltransferase-ähnliche Region, PHD = Zink Finger Domänen; SET = Su(var) 3-9; enhancer of zeste; trithorax) [24, Fig.1].

Ebenfalls werden in der Abbildung 3 einerseits die Anordnung der Introns und Extrons des MLL Gen sowie die BCR dargestellt. Andererseits werden schematisch das MLL Protein, welches das Produkt des MLL Gen nach erfolgter Transkription ist, sowie zwei 11q23 Abberationen, je eine Translokation und eine Duplikation des MLL Proteins, illustriert. Zu beachten ist insbesondere, dass sich am N-terminalen Ende MLL und am C-terminalen Ende der Fusionspartner befindet.

Es wird vermutet, dass der hauptsächliche onkogenetische Effekt des Fusionsproteins dadurch entsteht, dass es durch die Ersetzung von MLL Sequenzen mit entscheidenden Domänen des Fusionspartners zu einer Zunahme an Funktionen kommt. Es wurde gezeigt, dass ein C-terminaler Partner für die Immortalisation und schlussendlich für die Leukämogenese notwendig ist, obwohl die entscheidende Funktion des Fusionspartners noch unklar ist. Ebenfalls als notwendig erscheinen die weiter oben beschriebenen DNA-bindenden Strukturen von MLL. Diese Eigenschaften lassen darauf schliessen, dass MLL direkt mit DNA interagiert. Wie MLL in die Differenzierung eingreift ist noch nicht ganz verstanden und wird noch weitere Abklärungen nach sich ziehen. Verschiedene Experimente in vitro wie auch Knockout bzw. Knock-in Mäuse bezüglich MLL sowie Untersuchungen des MLL Proteins lassen darauf schliessen, dass eine Reduktion der MLL Aktivität die Ausreifung der hämatopoetischen Zellen beeinträchtigt, und dass die Expression eines onkogenen Fusionsproteins das Wachstumspotential vergrössert. MLL Fusionen kommen häufig bei Leukämien vor, so dass sie ein entscheidendes Ziel für antileukämische Therapien bilden und daher von speziellem Interesse sind [15, 16, 17, 23, 24, 28].

Abbildung 4 zeigt mittels Modellen mögliche onkogene Mechanismen einer Fusion von MLL mit einem Partner. Dabei wird immer zuerst im Abschnitt A die Funktion des Wildtyps und im Abschnitt B die Funktion des onkogenen Fusionsproteins dargestellt. Es wird angenommen, dass es durch eine Fusion entweder zu einer Überexpression, einer Unterexpression oder zu neuen Interaktionen kommen kann und dass somit in die Steuerung der Proliferation und Differenzierung eingegriffen wird.

MLL assoziierte chromosomale Translokationen sind generell mit einer schlechten Prognose charakterisiert. Die Präsenz einer MLL Translokation, zum Beispiel bei ALL, führt oft zu einem verfrühten Rezidiv nach Chemotherapie bei Kindern, ungleich wie bei anderen Typen von ALL bei Kindern. Vor allem auch bei Säuglingen hat ein 11q23 Rearrangement eine sehr schlechte Prognose [2, 24, 29, 30, 31]. Mit der DNA Microarray Technik konnte nachgewiesen werden, dass das Muster der Genexpression bei Patienten, welche eine MLL Translokation aufweisen, bei den einzelnen Subtypen der Leukämie unterschiedlich ist [31]. Ebenfalls konnte mittels der cDNA Microarray Technik gezeigt werden, dass die unterschiedliche Expression einzelner Gene ein gutes oder schlechtes Ansprechen gegenüber einer Chemotherapie aufweist, und so mit einer Chemosensitivität assoziiert wurden [32]. Einzelne MLL Translokationen wie zum Beispiel die t(4;11) und die t(9;11) sind mit einem schlechteren Outcome verbunden, verglichen mit anderen 11q23 Abberationen [33]. Das wachsende Verständnis der MLL Translokationen und der Identifikation sowie Charakte-

risierung der involvierten Gene wird in Zukunft eine entscheidende Rolle spielen bei der Diagnostik, der Klassifikation der Krankheit, sowie der Therapie der akuten Leukämie.

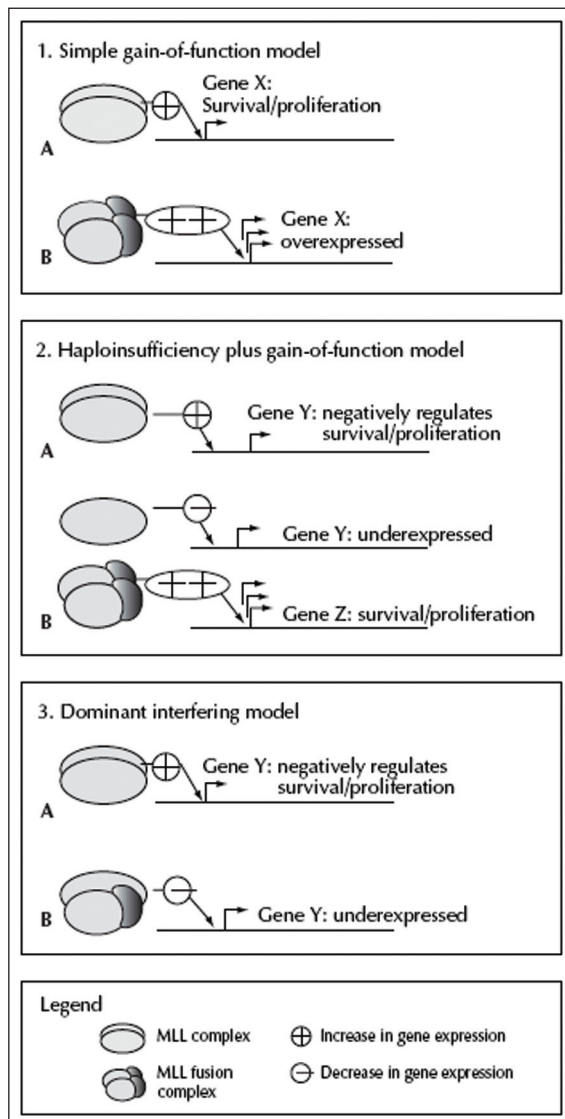


Abb. 4 Modelle, welche die normale Funktion von MLL sowie die veränderte Funktion bei Fusionen zeigen. Bei jedem Modell wird die Funktion der Wildtyp Expression von MLL jeweils im Abschnitt A aufgezeigt und die Funktion des onkogenen Fusionsproteins in leukämischen Zellen wird in Abschnitt B aufgezeigt. Die entscheidenden Zielgene X, Y und Z sind verschieden. Bei allen Modellen wird kein Unterschied gemacht, ob die verminderte Genexpression wegen einem Mangel an Aktivität oder durch eine vermehrte Repression stattfindet. [28]

Ziel dieser Arbeit

Bei einer Patientin, die im Rahmen einer AML (FAB M2) chemotherapeutisch behandelt wurde und sich in Remission befindet, konnte noch unter der Chemotherapie neu eine Translokation t(11;11)(q23;q13) nachgewiesen werden, die in der initialen Chromosomenanalyse der Leukämiezellen nicht vorhanden war. Dabei vermuteten wir einen neuen, bisher nicht beschriebenen Fusionspartner des MLL Gens. Ziel dieser Arbeit ist es, diesen neuen Fusionspartners des MLL Gens zu suchen, das Partnergen zu beschreiben und die möglichen Auswirkungen dieser Veränderung in Bezug auf die Hämatopoese bei der Patientin zu diskutieren. Die vorliegende neu aufgetretene Translokation ist insofern bemerkenswert, als dass sie in ungefähr 30-40% der aus dem Knochenmark kultivierten Zellen vorkommt, die Patientin jedoch keine klinische Symptomatik aufweist, und das Knochenmark morphologisch unauffällig erscheint. Eine mögliche Interpretation der Translokation wäre ein früher Hinweis auf eine Sekundärleukämie.

4. Material und Methoden

4.1 Patientin

Im Dezember 2000 präsentierte sich die damals 5-jährige Patientin im Kinderspital Zürich mit Fieber und Husten und wurde aufgrund einer Pneumonie behandelt. Im Blutbild zeigten sich Blasten. Die genaueren Abklärungen, welche eine Knochenmarkpunktion beinhalteten, ergaben die Diagnose einer akuten myeloischen Leukämie mit Ausreifung (AML, FAB M2). In der Chromosomenanalyse wurde eine für diesen Leukämietyp typische Translokation t(8;21) in einer Variantenform festgestellt. Bei dieser Translokation handelt es sich dabei um eine der häufigsten strukturellen Chromosomenaberrationen bei AML.

Im weiteren Verlauf wurde die Patientin gemäss Therapieprotokoll AML-BFM-98 mit intensiver mehrmonatiger Chemotherapie, perkutaner Radiotherapie des Ganzhirns sowie anschliessender Dauertherapie behandelt. Die Patientin kam rasch in eine Vollremission. Bei einer zytogenetischen Kontrolluntersuchung der Knochenmarkzellen im November 2001 zeigten sich keine pathologischen Veränderungen mehr.

Im Rahmen der Dauertherapie wurde 15 Monate nach Diagnose im Mai 2002 eine erneute Knochenmarkuntersuchung zur Überprüfung des Remissionsstatus durchgeführt. Sie zeigte morphologisch keine pathologischen Zellen. Die gleichzeitig durchgeführte zytogenetische Analyse zeigte aber erstmals einen neuen Klon mit chromosomaler Veränderung am langen Arm von Chromosom 11. Mittels FISH Analyse konnte nachgewiesen werden, dass es sich um ein MLL (11q23) Rearrangement, am ehesten mit einer Translokation t(11;11)(q13;q23), handelt. Ungefähr 40% der Zellen zeigten die Präsenz eines MLL Rearrangements auf. Im weiteren Verlauf blieb die Translokation auch nach Abschluss der Therapie nachweisbar. Die Anzahl der Zellen mit MLL Rearrangement verringerte sich jedoch seit Beginn bis zur letzten Beobachtung im Herbst 2004 auf 10%, verschwand aber nie vollständig. Die initiale Chromosomenveränderung t(8;21) konnte nie mehr nachgewiesen werden.

Auch 4 Jahre nach Diagnosestellung befindet sich die Patientin trotz persistierender zytogenetischer Veränderung (in 10-30% der Zellen im Knochenmark) noch immer in Vollremission und ohne klinische Symptomatik. Die Bedeutung der vorhandenen Translokation auf den weiteren Verlauf ist unklar, könnte aber möglicherweise ein früher Anhaltspunkt für die Entwicklung einer Sekundärleukämie sein. Mehrere Knochenmarksuntersuchungen blieben aber morphologisch unauffällig und die Zahl der Zellen mit Rearrangement nahm bisher auch nicht zu.

4.2 Methoden

Zell-Präparation

Aus Knochenmark wurden mononukleäre Zellen durch lysieren der Erythrozyten gewonnen.

Dazu wird Knochenmark in ein Tissue Culture (TC) Tube überführt und mit kaltem Lysing-Puffer (Ammoniumchlorid 0.83%, Kaliumhydrogenkarbonat 0.1%, Komplexon III 0.0037%, Kantonsapotheke Zürich) aufgefüllt (Verhältnis 1:5, 1 Teil Probe und 4 Teile Lysing-Puffer). Durch vorsichtiges Kippen wird gut gemischt und im Kühlschrank 10min inkubiert.

5min bei 1000 U/min (208g) zentrifugieren.

Überstand verwerfen, Pellet mit PBS resuspendieren und Röhrchen auffüllen, vorsichtig mischen.

5min bei 1000 U/min zentrifugieren.

Überstand verwerfen.

Die Probe kann nun zur direkten Weiterverarbeitung verwendet werden oder aber in RPMI Medium (20% FBS, 10% DMSO) gelöst und anschliessend in flüssigem Stickstoff aufbewahrt werden.

DNA – Isolation

Falls tiefgefrorene Zellen verwendet werden, müssen diese zuerst aufgetaut werden. Proben in 37° C warmen Wasserbad auftauen, zweimal mit PBS waschen. Zellen in PBS lösen, während 5min zentrifugieren bei 300x g, Überstand verwerfen.

Anschliessende DNA Isolation mit DNA Blood Mini Kit (Qiagen) gemäss Protokoll bei einer geschätzten Zellzahl von ungefähr 1×10^7 .

RNA – Isolation

Kombination aus Trizol, RNeasy Mini Kit (Qiagen) und DNase-Verdau

Zell-material:

Tiefgefrorene Zellen, in Tube mit RPMI-Medium bei flüssigem Stickstoff gelagert

Lyse und Extraktion:

Proben bei 37°C im Wasserbad auftauen, in PBS lösen und Pellet durch Zentrifugation (300x g, 5 min) bilden. Überstand verwerfen, erneutes Waschen mit PBS und Überstand verwerfen.

Zellen in 1 ml Trizol (Invitrogen) durch repetitives Pipettieren lysieren, 5min bei Raumtemperatur warten

(Transfer vom 14ml Falcon Tube in ein 1.5ml Eppendorf Tube)

200µl Chloroform hinzufügen und kräftig von Hand für 15 sec schütteln, 2min warten bei Raumtemperatur

Zentrifugieren bei 4° (12000x g, 15min)

Obere Phase abnehmen (ca. 500µl in ein neues 1.5ml Eppendorf Tube transferieren)

1 Volumen 70% EtOH hinzufügen, gut mischen durch repetitives Pipettieren

Probe auf eine RNeasy mini spin Säule auftragen (in zwei Schritten)

Zentrifugation (zweimal) für 15sec bei $\geq 8000x$ g (≥ 10000 rpm), Durchfluss verwerfen

350µl Puffer RW1 hinzufügen, für 15sec bei $\geq 8000x$ g (≥ 10000 rpm) zentrifugieren, Durchfluss verwerfen

80µl DNase I (10µl Stock Lösung und 70µl Puffer RDD) auf die Säule auftragen

15min bei Raumtemperatur warten

350µl Puffer RW1 hinzufügen, für 15sec bei $\geq 8000x$ g (≥ 10000 rpm) zentrifugieren, Durchfluss verwerfen

RNeasy Säule in ein neues 2ml Sammel Tube transferieren

500µl Puffer RPE hinzufügen, für 15sec bei $\geq 8000x$ g (≥ 10000 rpm) zentrifugieren, Durchfluss verwerfen

Weitere 500µl Puffer RPE hinzufügen, für 2min bei $\geq 8000x$ g (≥ 10000 rpm) zentrifugieren

Für die Elution RNeasy Säule in ein neues 1.5ml Sammel Tube transferieren

Eluieren mit 30µl RNase-freiem Wasser (für 1min bei $\geq 8000x$ g (≥ 10000 rpm) zentrifugieren)

Diesen Eluations-Schritt wiederholen, indem das Eluat vom ersten Mal benützt wird

Quantitätsmessung mittels Photometer

Qualitätsmessung mittels Elektrophorese

Aufbewahrung bei -80°C

Panhandle PCR

Schritt 1: BamHI Verdau und Behandlung mit alkalischer Phosphatase aus Kalbsdarm

- (1) 100µl Ansatz mit 5µg genomische DNA, 4µl BamHI (Promega, 10 U/µl; 40 U (8 U/µg) benötigt), 10µl 10x Promega Buffer E und entsprechender Menge DEPC-behandeltem Wasser herstellen.
Inkubieren während 2h bei 37° C.
- (2) DNA-Dephosphorylierung mit 0.05 U alkalischer Phosphatase aus Kalbsdarm (Roche). 100µl Stocklösung von 0.01 U/µl herstellen indem die 1 U/µl Lösung vom Hersteller 1:100 mit 10mM Tris-Hcl/1mM EDTA (TE) Puffer verdünnt wird. Anschliessend 5µl der 0.01U/µl Lösung zum DNA Verdau hinzugeben und die 105µl Reaktion bei 37° C für 30min inkubieren.
- (3) Reinigung der verdauten und dephosphorylierten DNA mit GENECLAN TurboKit (BIO 101) entsprechend den Anweisungen des Herstellers für 5µg genomische DNA. Eluation der gereinigten DNA in ein Endvolumen von 50µl TE Puffer.

Schritt 2: Ligation von einem einfachsträngigen 5' phosphorylierten Oligonukleotid an das 3' Ende

Sequenz des 5' phosphorylierten Oligonukleotid für die Amplifikation des Bruchpunktes auf dem der(11) Chromosom ist 5'-GAT CGA AGC TGG AGT GGT GGC CTG TTT GGA TTC AGG-3'.

- (1) Resuspension des 5' phosphorylierten Oligonukleotid in dH₂O zu einer Endkonzentration von 0.25µg/µl.
- (2) Ligationsmix mit einem Endvolumen von 50µl herstellen: 16.9µl dH₂O, 25µl (~2.5µg) der verdauten, dephosphorylierten DNA, 2.1 µl (516 ng) des 5' phosphorylierten Oligonukleotid, 5µl 10x Ligations Puffer, und 1µl Weiss Unit/µl T4 DNA Ligase (Roche). Über Nacht bei 4° C inkubieren.
- (3) Reinigung der verdauten und dephosphorylierten DNA mit GENECLAN TurboKit (BIO 101) entsprechend den Anweisungen des Herstellers für 5µg DNA. Eluation der ligierten DNA in ein Endvolumen von 25µl TE Puffer.

Schritt 3: Panhandle Formation: DNA zu Taq/dNTP Mix hinzugeben, Denaturation, intrastrand annealing und Polymerase Extension

- (1) 25µl PCR Ansatz aus 16.75µl dH₂O, 0.75µl (2.5 U) Taq/Pwo DNA Polymerase (Expand Long Template PCR System, Roche), 5µl 10x PCR Reaktion Puffer Nr.2, 2.5µl dNTP Mix (10mM/µl; Invitrogen). Um nicht-spezifisches Annealen und Polymerisation zu verhindern, Tube in der PCR Maschine auf 80° C vorheizen.
- (2) 200ng der verdauten, dephosphorylierten DNA zu der vorgewärmten Lösung hinzufügen. Reaktionsmix bei 94° C zur Denaturation für 1min heizen.

- (3) Für die intrastrand annealing des ligierten Oligonukleotid zur komplementären Sequenz in MLL und Polymerase Extension des 3' Ende, folgt der Denaturation eine Rampe von 94° C auf 72° C während einer Dauer von 2min und anschliessende Inkubation für 30sec bei 72° C.
- (4) Aufheizen auf 80° C bevor die Primer in Schritt 4 dazugegeben werden, um nicht-spezifische Produkte zu verhindern (Hot Start für das initiale PCR)

Schritt 4: Hinzufügen der MLL Primer 1 und 2 und thermische Zyklen

- (1) Je 12.5 pmol von MLL Primer 1 und MLL Primer 2 (beide je in einem Volumen von 2.5µl) zur vorgeheizten Reaktionslösung dazugeben, was einem Endvolumen von 50µl entspricht.
- (2) Um das Produkt zu amplifizieren, wird folgender Zyklus verwendet: Initiale Denaturation bei 94° C für 1min, anschliessend 30 Zyklen mit 94° C für Denaturation während 10sec und Elongation bei 68° C für 7min. Endelongation bei 68° C für 7min, anschliessend Stopp bei 4° C bis zur Produktentnahme.

Schritt 5: Nested PCR ausführen mit den MLL Primern 3 und 4

- (1) PCR Reaktionslösung mit 2µl aus dem PCR der ersten Runde, 34.75µl dH₂O, 0.75µl (2.5 U) Taq/Pwo DNA Polymerase (Expand Long Template PCR System, Roche), 5µl 10x PCR Reaktion Puffer Nr.2, 2.5µl dNTP Mix (10mM/µl; Invitrogen), sowie je 12.5 pmol von MLL Primer 3 und MLL Primer 4 (beide je in einem Volumen von 2.5µl). Um nicht-spezifisches Annealen und Polymerisation zu verhindern, Tube in der PCR Maschine auf 80° C vorheizen. Gleiche Konditionen für die thermischen Zyklen wie im initialen PCR verwenden.

PCR Produktanalyse

Nach dem Ablauf der Kettenreaktion wurde der PCR Reaktionslösung 18µl entnommen und mit 2µl Ladepuffer versetzt. Anschliessend wurden die 20µl auf ein 1% Agarose Gel aufgetragen und bei 80 Volt ungefähr 1h in TAE-Pufferlösung mit Ethidiumbromid aufgetrennt. Die Banden wurden unter UV-Licht visualisiert.

Sequenzierung

DNA Extraktion aus Agarosegel und Reinigung mit GENE CLEAN Turbo Kit (BIO 101) gemäss der Anleitung des Herstellers. Anschliessend Sequenzier-PCR nach ABI Prism 310 (DNA Sequencing Kit, Perkin Elmer): 20µl Ansatz mit 1 – 2µl PCR Produkt, 13 – 14µl dH₂O, 4µl Terminator ready Reaction Mix, 1µl Sequenzier-Primer (10pmol/µl).

PCR mit initialer Denaturation bei 96° C für 1min, dann 25 Zyklen mit 96° C für 10sec, 50° C für 5sec, 60° für 4min; Stopp bei 4° C bis zur Produktentnahme. Nach erfolgreichem PCR Produktreinigung mit DyeEx-Spin-Kit (Qiagen) nach der Anleitung des Herstellers. Resuspension des Pellet in 15µl TSR (Templet Suppression reagent, ABI PRISM 310). Kurz vortexen und zentrifugieren. Proben für 2min bei 95° C inkubieren, danach auf Eis stellen. Kurz vortexen und zentrifugieren. Bis zur Analyse im ABI PRISM 310 auf Eis bewahren.

RACE – RNA Ligase-vermittelte schnelle Amplifikation von 5' und 3' cDNA

Enden

cDNA herstellen

Gemäss der Anleitung des Herstellers wurde ~ 1µg der isolierten und unbehandelten mRNA mit dem GeneRacerTm Kit von Invitrogen in cDNA umgeschrieben. Weil das 3'-Ende von Interesse war, konnte direkt die reverse Transkription mit SuperScriptTm II begonnen werden. Als Primer dafür verwendete ich den GeneRacerTm Oligo dT Primer.

Amplifikation der cDNA

Nach der reversen Transkription erfolgte ein Touchdown PCR zur Amplifikation der cDNA. Dabei wurde das PCR nach folgendem Schema durchgeführt: 50µl PCR Ansatz mit 1µl cDNA, 35.75µl dH₂O, 0.75µl (2.5 U) Taq/Pwo DNA Polymerase (Expand Long Template PCR System, Roche), 5µl 10x PCR Reaktion Puffer Nr.2, 2.5µl dNTP Mix (10mM/µl; Invitrogen), sowie als 5' GSP Primer (Gen Spezifischer Primer) 1.5µl MLL Primer 2 (300nM in Endkonzentration) und 1.5µl GeneRacerTm 3' Primer (300nM in Endkonzentration). Um nicht-spezifisches Annealen und Polymerisation zu verhindern, Tube in der PCR Maschine auf 80° C vorheizen und Enzym unmittelbar vor dem Start dazugeben. Es folgt ein Touchdown-PCR mit initialer Denaturation für 2min bei 94° C, danach 5 Zyklen mit 94° C für 10sec, 72° C für 30sec und 68° C für 7min; 5 Zyklen mit 94° C für 10sec, 70° C für 30sec und 68° C für 7min sowie 25 Zyklen mit 94° C für 10sec, 68° C für 30sec und 68° C für 7min; Endelongation bei 68° C für 7min, anschliessend Stopp bei 4° C bis zur Entnahme.

Nested PCR zur Verbesserung der Spezifität und Sensitivität

Nested PCR mit den gleichen Konditionen wie vorheriges PCR, 1µl des vorherigen PCR anstelle der cDNA. Primer sind diesmal MLL Primer 4 für das 5'-Ende und GeneRacerTm 3' Nested Primer für das 3'-Ende.

Klonieren mit Topo TA-Cloning-Kit

Vorbereitung zum Klonieren

Die entsprechenden Banden zum Klonieren wurden aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit GENE CLEAN Turbo Kit (BIO 101) gemäss Anleitung des Herstellers extrahiert und gereinigt. Das Eluat von 30µl wurde mit der Vakuumzentrifuge auf 4µl eingedampft. Da beim PCR die Taq/Pwo DNA Polymerase (Expand Long Template PCR System, Roche) eingesetzt wurde, waren die Voraussetzungen für einen 3' A-Überhang geschaffen.

Klonieren

Nach Angaben des Herstellers wurde die TOPO® Cloning Reaction (Invitrogen) hergestellt mit 4µl PCR Produkt, 1µl Salt Solution und 1µl TOPO® vector für die Transformation mit den One Shot® chemisch kompetenten E.coli. Verschiedene Konzentrationen der Reaktionslösungen (RL) wurden auf den LB-Agarose-Ampicillin Platten (50µg/ml Ampicillin) ausgebracht: 10µl RL + 90µl LB Medium, 50µl RL + 50µl LB sowie 100µl RL. Die Medien wurden über Nacht bei 37° C inkubiert.

Analyse der Transformation

Bei den über Nacht gewachsenen Kolonien wurden von jeder Schale 3 Kolonien ausgewählt und über Nacht bei 37° C bei 200rpm in LB Medium welches 100µg/ml Ampicillin enthält, inkubiert. Die Plasmide wurden mit Qiagen Mini Prep isoliert.

Plasmid-Isolierung mit QIAGEN Mini Prep

Verfahren gemäss den Angaben des Herstellers (Mini Prep, Qiagen). Als Restriktionsenzym wurde EcoRI (Promega) benutzt in folgendem Ansatz: 20µl Verdau mit 10µl DNA aus den jeweiligen LB Medien, 1µl EcoRI (Promega), 2µl 10x Puffer (Promega), 7µl dH₂O. Inkubation bei 37° C für 1h. Anschliessend wurde der Verdau auf ein 1%-Agarosegel aufgetragen, die Bande ausgeschnitten, gereinigt und mit dem ABI PRISM 310 wie weiter oben beschrieben sequenziert.

FISH mit markierter BAC DNA

Die aus Bakterien gewonnene BAC DNA wird mittels Nicktranslationn gelabelt.

Probenmaterial

BAC DNA aus dem Hi Speed Plasmid Midi Purification Kit (Qiagen) in H₂O.

Material und Reagenzien

BioNick labeling System, Cot-1 DNA (GIBCO BRL, Invitrogen)

Lachsspermien-DNA, Dextran Sulfat, Sodium Acetate, deionisiertes Formamide (Sigma-Alderich Chemie GmbH, Buchs SG)

SSC (Standard saline citrat), 20xSSC fertig erhältlich (IG Instrumenten Gesellschaft AG, Zürich)

Antikörpergemisch I: Mouse anti biotin 1:10 Verdünnung mit 2% BSA/PBS

Antikörpergemisch II: Rabbit anti mouse (TRITC) 1:20 Verdünnung mit 2% BSA/PBS (beide Antikörpergemische von DAKO Diagnostics AG)

Arbeitsablauf

Nicktranslation

Folgende Komponenten werden auf Eis in ein 1.5ml Eppendorf Tube pipettiert:

5 µl 10x dNTP Mix

5 µl 10x Enzyme Mix

_ µl DNA (1µg)

_ µl H₂O auf 45 µl auffüllen

alles mischen und kurz zentrifugieren

2h bei 16°C inkubieren

5 µl Stop Lösung dazupipettieren

Um die nicht inkorporierten Nukleotide von der gelabelten DNA Probe zu entfernen, wird die DNA mit Ethanol gefällt.

2.5 µl Lachsspermien-DNA (25µg)

20 µl human Cot-1 DNA (20µg)

7.8 µl NaOAc 3M

209 µl ice-cold EtOH 100%

über Nacht bei -20°C fällen lassen

für 15 min mit 12000 rpm bei 4°C zentrifugieren

Pellet bei 45°C trocknen lassen

Hybridisierungsmix:

500 µl deionisiertes Formamide
100 µl 20x SSC
200 µl Dextran Sulfate 50%
200 µl H₂O

Pellet in 15 µl Hybridisierungsmix lösen.

Hybridisierung

Die präparierten Objektträger werden in aufsteigender Alkoholreihe entwässert. Je 2 min in 70%, 80% und 100% EtOH.

15 µl Hybridisierungsmix auf die entsprechende Stelle des Objektträgers pipettieren und mit dem Deckglas (21x26mm) eindecken und mit Rubber Cement luftdicht eingummieren.

Im Hybridisierungsgerät:

5 min bei 75°C

Über Nacht bei 37°C inkubieren

Rubber Cement entfernen und Deckglas sorgfältig entfernen

In 2xSSC für 5 min waschen

50% Formamide in 2xSSC bei 42°C für 15 min

2xSSC bei 42°C 2x7min

Objektträger herausnehmen, abkanten und auf das Tela legen.

Die Objektträger mit 100 µl 2% BSA/PBS für 15 min bei 37°C im Hybridisierungsgerät blocken.

Deckglas entfernen und auf das Präparat 60 µl des Antikörpergemischs I pipettieren.

Mit Deckglas eindecken und 30 min bei 37°C inkubieren.

2x7 min bei 42°C in 4xSSC/0.1% Tween20 waschen.

60 µl Antikörpergemisch II auf das Präparat pipettieren. Mit Deckglas eindecken und 30 min bei 37°C inkubieren.

2x7 min bei 42°C in 4xSSC/0.1% Tween20 waschen.

Für 7 min in 4% Formalin in 1xPBS bei 4°C inkubieren.

2x5min in 1xPBS waschen

Objektträger in aufsteigender Alkoholreihe entwässern und 2 min trocknen lassen.

Mit 10 µl DAP II Counterstain färben und mit einem Deckglas eindecken und mit Nagellack umranden.

Sequenzen der verwendeten Primer und Oligonukleotide

Primer Name	Basensequenz
Oligonukleotid (bei Panhandle eingesetzt)	5'-GAT CGA AGC TGG AGT GGT GGC CTG TTT GGA TTC AGG-3'
MLL Primer 1	5'-TCC TCC ACG AAA GCC CGT CGA G-3'
MLL Primer 2	5'-TCA AGC AGG TCT CCC AGC CAG CAC-3'
MLL Primer 3	5'-A GCT GGA TCC GGA AAA GAG TGA AGA AGG GAA TGT CTC GG-3'
MLL Primer 4	5'-A GCT GGA TCC GTG GTC ATC CCG CCT CAG CCA C-3'
GeneRacerTm Oligo dT Primer (bei RACE eingesetzt)	5'-GCT GTC AAC GAT ACG CTA CGT AAC GGC ATG ACA GTG (T) ₁₈ -3'
GeneRacerTm 3' Primer	5'-GCT GTC AAC GAT ACG CTA CGT AAC G-3'
GeneRacerTm 3' Nested Primer	5'-CGC TAC GTA ACG GCA TGA CAG TG-3'

5. Resultate

Blutuntersuchung und Karyogramm

Bei der Blutuntersuchung der Patientin anlässlich einer Behandlung aufgrund einer Pneumonie wurden im Dezember 2000 im Blut blastäre Zellen festgestellt. Bei der anschliessenden Knochenmarkpunktion wurde eine AML festgestellt welche nach FAB in den Subtyp M2 eingeteilt wurde. Die Karyotypisierung der Leukämiezellen ergab eine für diesen Subtyp der Leukämie eine Variante der sonst typischen Translokation t(8;21). Die Therapie wurde auf Grund der Risikostratifizierung mit einer Polychemotherapie eingeleitet. Programmgemäss erfolgte eine Vollremission, in der im Knochenmark keine zytogenetischen Veränderungen mehr nachgewiesen werden konnten. Anlässlich einer routinemässigen zytogenetischen Verlaufskontrolle vor Ende der Chemotherapie im Mai 2002 wurde unerwarteterweise ein neuer Klon entdeckt: Auf Chromosom 11 war eine de novo Translokation sichtbar. Im Karyogramm (Abbildung 5) ist die Translokation beim Chromosom 11 gut erkennbar.

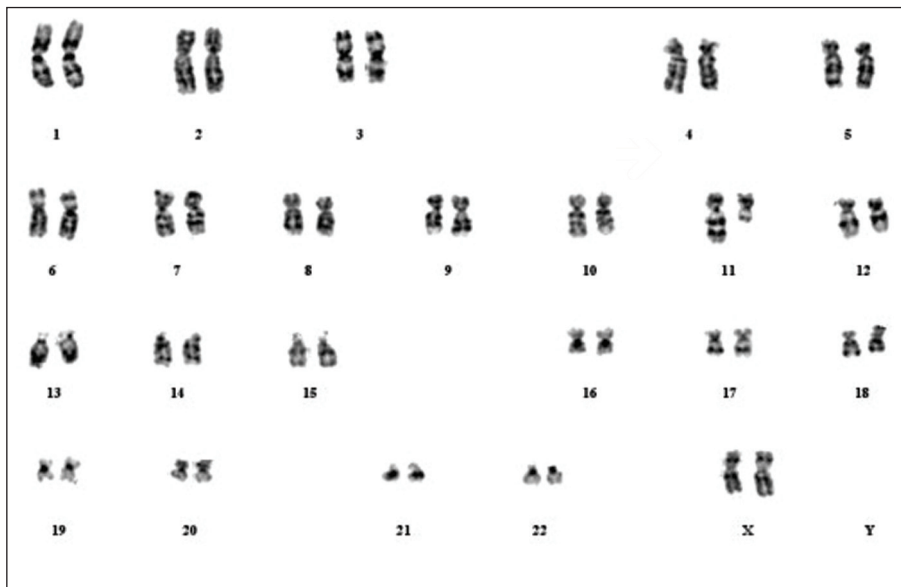


Abb. 5 Karyogramm bei der zytogenetischen Untersuchung vom Mai 2002. Gut sichtbar ist die Translokation beim Chromosom 11 bei Karyotyp 46,XX,t(11;11)(q13;q23) (fecit David Betts, Onkologielabor Universitäts-Kinderklinik Zürich).

Nachweis der Translokation und Lokalisierung des Bruchpunktes

Zur genaueren Einteilung der im Karyogramm sichtbaren Translokation des Chromosoms 11 und unter der Annahme, dass das MLL-Gen im Bereiche 11q23 involviert ist, wurde eine FISH Analyse durchgeführt. Dies ist eine molekularzytogenetische Methode zur farbigen Darstellung von ausgewählten Chromosomenabschnitten oder Chromosomen mittels Fluoreszenzmikroskopie. Hierbei erfolgt die Hybridisierung der DNA-Sonden in-situ auf die Chromosomen- bzw. Zellpräparate. Unter dem Fluoreszenzmikroskop werden bei intaktem

Chromosom die grüne Bande, welche sich centromerisch der BCR und die rote Bande, welche sich telomerisch der BCR von MLL auf 11q23 befindet, nebeneinander erscheinen. Sollte eine Translokation zwischen den beiden hybridisierten Chromosomenabschnitten stattgefunden haben, so kommt es zu einer Trennung der beiden angefärbten Banden. In Abbildung 6 kann klar ersichtlich nachgewiesen werden, dass es in diesem Falle zu einem Rearrangement des MLL-Genabschnittes gekommen ist, in dem der grüne und rote Genabschnitt auseinander gedriftet sind. Damit konnte bewiesen werden, dass das MLL Gen beteiligt ist und es sich vermutlich um eine Translokation von der Region 11q23 mit der Region 11q13 handelt im Sinne einer $t(11;11)(q13;q23)$.

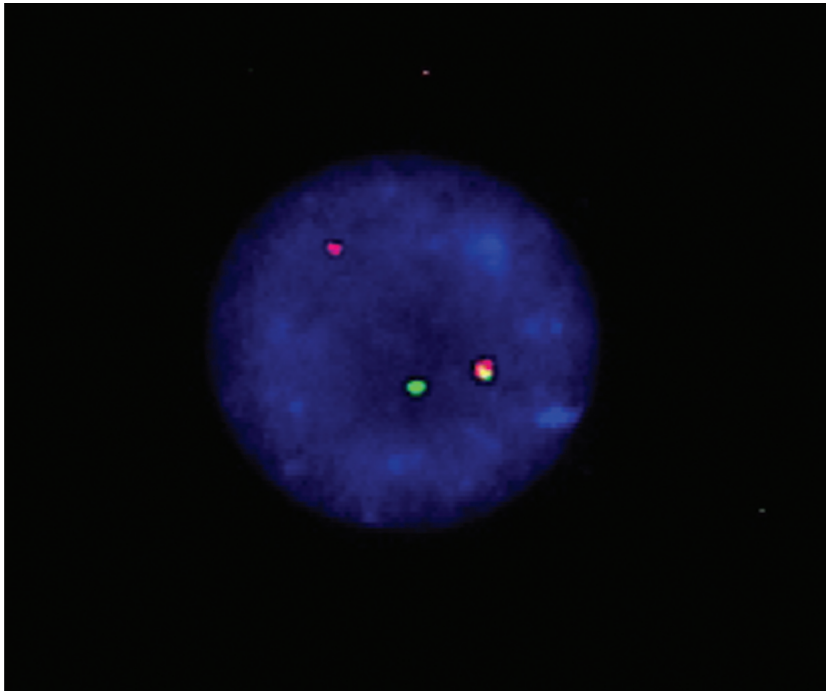


Abb. 6 FISH Analyse zum Beweis dass der MLL - Locus in die Translokation involviert ist: beim intakten MLL sind die grüne und rote Bande jeweils zusammen, eine Trennung der roten und grünen Bande weist auf ein MLL-Rearrangement hin. Die rote Bande befindet sich telomerisch der BCR, die grüne Bande centromerisch der BCR von MLL auf 11q23 (fecit David Betts, Onkologielabor Universitäts-Kinderklinik Zürich).

Da es sich bei dieser Art von Translokation um einen neuen, in der Literatur nicht beschriebenen Fall handelt, wurde zur genaueren Lokalisierung des Bruchpunktes mit Hilfe von BAC Klonen nochmals FISH Analysen durchgeführt. BAC's repräsentieren das menschliche Genom in Plasmiden von E.coli und können zusammen als Gerüst dienen, mittels dem viel kürzere DNA Sequenzen ermittelt werden. Bei diesem Verfahren dienten die BAC Klone als DNA Sonden zur Hybridisierung für die FISH. Bei Abbildung 7a wurde die Bande 11q13.3 mit RP11-300I6 eingefärbt. Der markierte Chromosomenabschnitt befindet sich vor dem Bruchpunkt, somit muss der Bruchpunkt weiter telomerisch liegen. In der Abbildung 7b wurde die Bande 11q13.4 mit RP11-456I15 eingefärbt. Hier konnte gezeigt werden, dass sich der Bruchpunkt vor der Bande 11q13.4 befinden muss, das heisst weiter centromerisch. Somit konnte der Bruchpunkt zwischen den Abschnitten 11q13.3 und 11q13.4 lokalisiert werden.

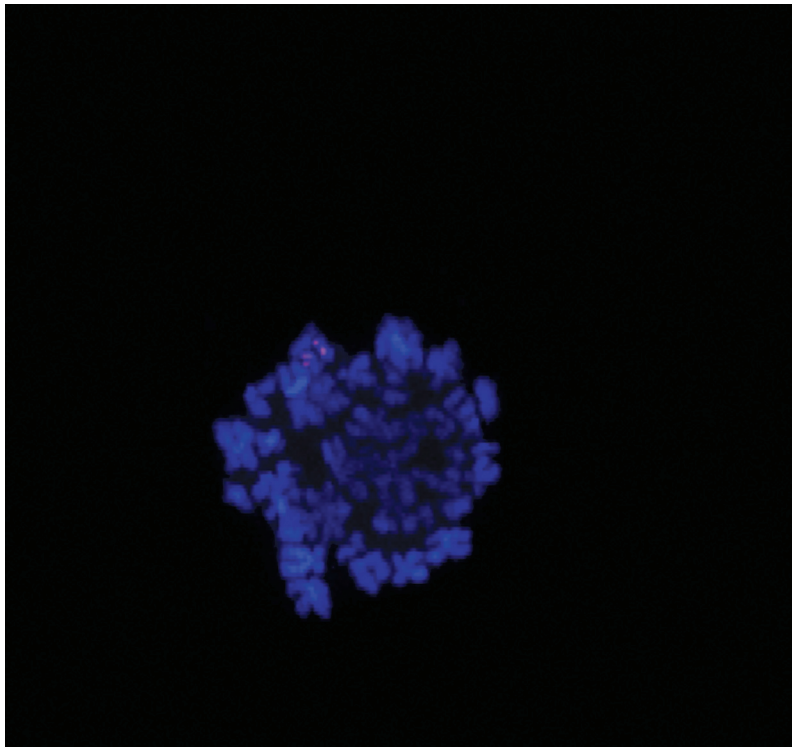


Abb. 7a

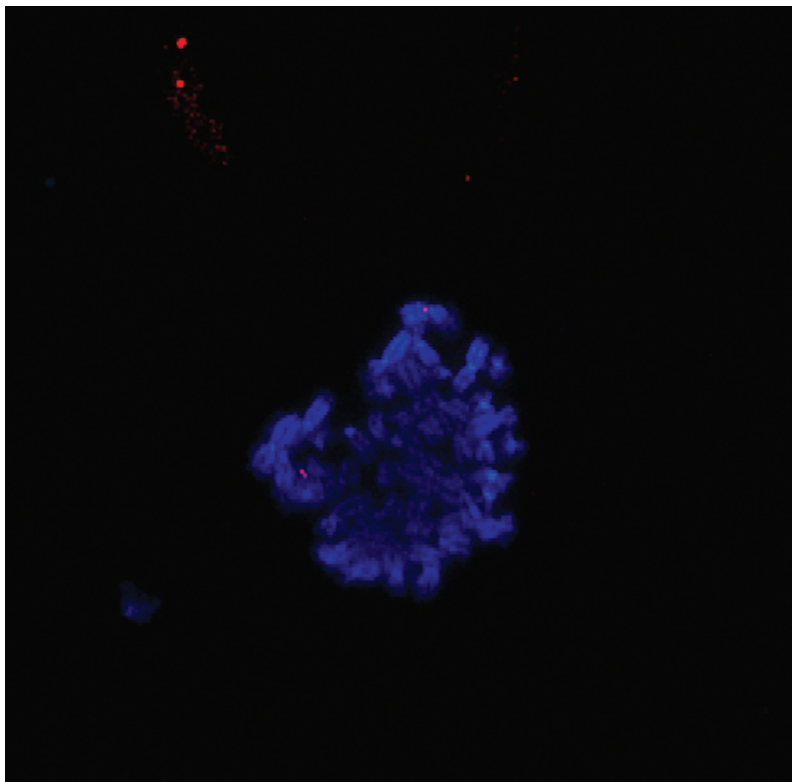


Abb. 7b

Abb. 7.a und 7.b Bei Abb. 7a wurde mit RP11-300I6 die Bande 11q13.3 eingefärbt. Dadurch ist zu sehen, dass der Bruchpunkt weiter telomerisch liegen muss als die Bande 11q13.3. Mit RP11-456I15 wurde in Abb. 7b die Bande 11q13.4 eingefärbt, wobei hier gezeigt werden konnte, dass sich der Bruchpunkt vor der Bande 11q13.4 befinden muss, d.h. weiter centromerisch (fecit David Betts und André Fitsche, Onkologielabor Universitäts-Kinderklinik Zürich).

Identifikation des Partnergens auf genomischer Ebene

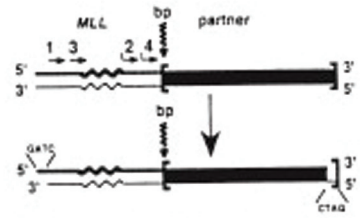
Nächstes Ziel war, das potentielle Partnergen von MLL, welches mit BAC's zwischen 11q13.3. und 11q13.4 auf dem Chromosom 11 eingrenzen liess, zu finden. Um dies auf genomischer Ebene zu ermöglichen, wandte ich das Panhandle PCR an, eine Technik, die häufig bei MLL Translokationen verwendet wird [24]. Bekannt ist, dass sich bei Fusionsprodukten von MLL Translokationen am 5' Ende immer MLL befindet und am 3' Ende das Partnergen, wie weiter oben beschrieben und in Abbildung 3 illustriert.

Das Panhandle PCR wurde entwickelt, um genomische DNA mit bekanntem 5' Ende und unbekanntem 3' Ende zu vervielfältigen. Die PCR ist die enzymatische DNA-Vervielfältigung einer Zielsequenz, bei der in mehreren Amplifizierungsrunden (= Zyklen) Primer entlang einer Matrizen-DNA verlängert werden. Dabei wechselt die Temperatur periodisch, so dass die DNA immer wieder denaturiert wird und sich die Primer anlagern und verlängert werden können. Die von den Primermolekülen eingefasste DNA-Sequenz wird exponentiell vermehrt. Die PCR wird in einem sogenannten Thermocycler durchgeführt. Die Bruchpunktregion von MLL (BCR) liegt in einer 8.3kb Region zwischen Exon 5 und Exon 11, eine Länge, die für PCR möglich ist. In Abbildung 8 wird die Panhandle PCR Technik schematisch dargestellt: Zuerst wird die genomische DNA mit BamHI verdaut, ein Enzym, welches nicht innerhalb der BCR schneidet, und so ein Produkt generiert, an dessen 5' Ende MLL und am 3' Ende das unbekannte Partnergen ist. Danach wird dephosphoryliert und eine bekannte Sequenz eines phosphorylierten Oligonukleotid, welches komplementär zu einer Region in Exon 5 von MLL ist an das 3' Ende des unbekannten Partnergen ligiert. Somit besteht eine neue Situation, in der sich nun an beiden Enden MLL befindet. Anschliessend kommt es zur Panhandle Bildung im eigentlichen Sinne (engl. pan = Pfanne; handle = Griff): Nach erfolgter Denaturierung kommt es zum intrastrand annealing des komplementären 3' Ende an das 5' Ende und Polymerase Extension zur Verlängerung des 3' Ende mit MLL Sequenz. Darauf können die MLL spezifischen 5' und 3' Primer dazugegeben und die erste Runde des PCR durchgeführt werden. Zur Verbesserung der Spezifität und Sensitivität wird ein Nested PCR durchgeführt, in dem die MLL Primer am 5' und 3' Ende beide weiter nach innen versetzt sind. Wir haben also nun ein amplifiziertes Produkt, in welchem sich an beiden Enden MLL und dazwischen das unbekannte Partnergen befindet.

Bei der mehrmaligen Durchführung des Panhandle PCR mit genomischer DNA aus verschiedenen Proben der Patientin bekam ich jeweils eine Bande zwischen 9 – 10 Kbp Länge. Während die Bande bei der ersten Runde des PCR noch nicht gut sichtbar war, wurde sie bei weiterer Amplifikation mit dem Nested PCR besser erkennbar. Bei der verwendeten Annealing Temperatur, die der Temperatur der Elongation entspricht, gibt es Einbussen in der Spezifität, weshalb sich jeweils auch viel Hintergrund amplifiziert hat. Zudem ist das Produkt relativ lang, und somit steigt die Wahrscheinlichkeit, dass die Primer nicht nur an den Enden binden können, sondern auch innerhalb des eigentlich zu amplifizierenden Produktes.

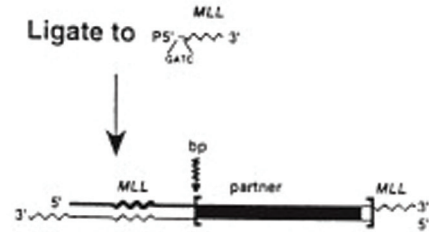
Step 1.

Digest with *Bam*HI
Treat with Calf Intestinal Alkaline
Phosphatase



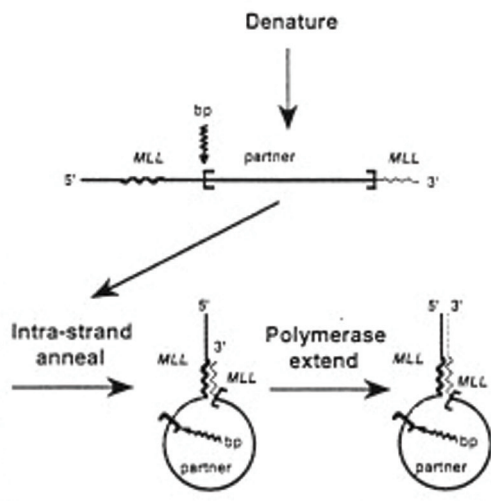
Step 2.

Ligate to



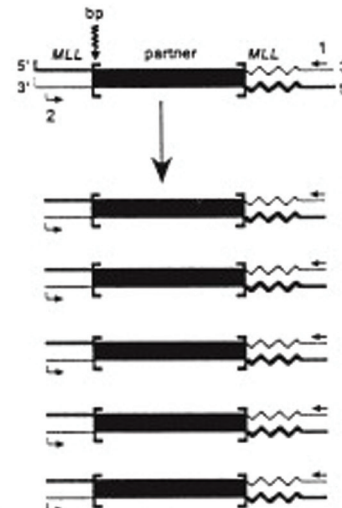
Step 3.

Add to *Taq* / dNTPs



Step 4.

Add primers 1 and 2 / Thermal cycle



Step 5.

Amplify with nested primers 3 and 4

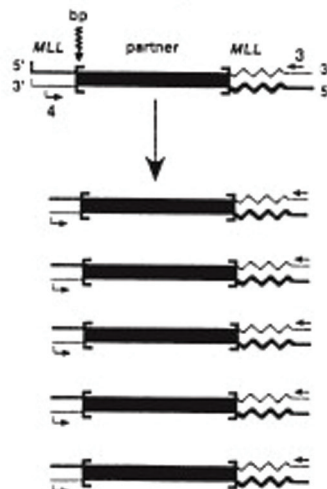


Abb. 8 Schematische Darstellung der Panhandle PCR Technik. In Kapitel 4 wurden die einzelnen Schritte beschrieben (24).

In Abbildung 9 wird das Ergebnis eines Panhandle PCR veranschaulicht. Während in der ersten Runde des PCR mit den MLL Primern 1 und 2 die erwartete Bande zwischen 9 – 10 Kbp nur schwach erkennbar ist (Reihe B – D), wird bei erfolgtem Nested PCR mit den MLL Primern 3 und 4 die Bande deutlich sichtbarer (Reihe F – H). Ebenfalls ist gut zu sehen, dass relativ viel Hintergrund amplifiziert wurde, möglicherweise weil die Primer nicht nur an den Enden, sondern auch innerhalb des zu amplifizierenden Produkts binden.

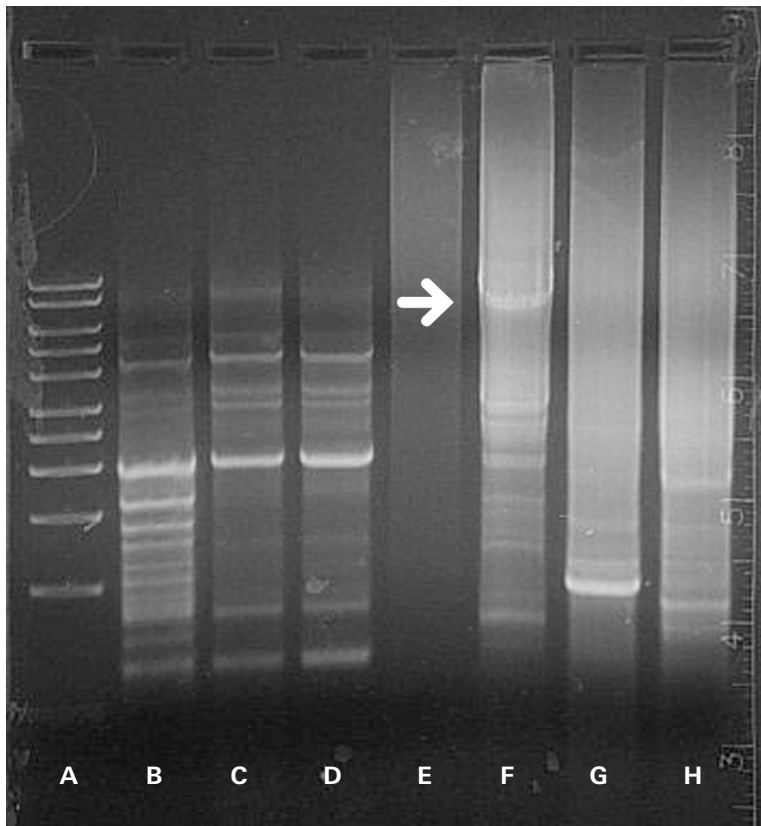


Abb. 9 Panhandle PCR. A: 1Kbp Marker; B – D: Erste Runde des Panhandle PCR mit unterschiedlich eingesetzten Konzentrationen für das PCR: in A 2µl, in C 5µl, in D 10µl der Ligationslösung. F- H: Nested PCR mit je 2µl in F von B, in G von C und in H von D. Gut sichtbar ist nun in F die Bande zwischen 9 – 10 Kbp. E ist die Negativkontrolle ohne DNA.

Die Bande zwischen 9 - 10Kbp wurde zur weiteren Charakterisierung ausgeschnitten, mit GENE CLEAN gereinigt und anschliessend im ABI PRISM 310 sequenziert. Dabei konnte vom 5' Ende her mit dem MLL Primer 4 die Sequenz gut abgelesen werden: Wie erwartet war es MLL. Vom 3' Ende her erwies sich die Sequenzierung als schwieriger, aber es wurde ebenfalls nur MLL gefunden. In den Abbildungen 10a und 10b werden die Resultate der Suche in der genomischen Datenbank nach passenden Gensequenzen, die mit der erhaltenen Sequenz des Panhandle PCR Produktes übereinstimmen, aufgezeigt. Im oberen Abschnitt des Vergleiches wird jeweils die Anfrage (Query) und im unteren Abschnitt die übereinstimmende Gensequenz aus der Datenbank (Subjct) dargestellt. In der Abbildung 10a wird die Sequenz des Panhandle PCR vom 5' Ende mit der Datenbank verglichen. Dabei ergab die Suche MLL auf Intron 7. Dadurch wurde bestätigt, am richtigen Produkt zu arbeiten. In der Abbildung 10b wurde die Sequenz des 3' Ende des Panhandle PCR Produktes mit der Datenbank verglichen. Die Suche ergab jedoch auch hier MLL auf Intron 11, es konnte kein Partnergen identifiziert werden. Somit konnte auf genomischer Ebene mit dem Panhandle PCR nur nachgewiesen werden, dass das Panhandle funktioniert hat, und dass mit dem richtigen Abschnitt des Chromosoms 11 gearbeitet wurde.

```

Query: 1      aagaagttccc-aaacc-ctcctagttagagccc-agaaaaagcagcctccaccaccagaat 57
            |||
Sbjct: 21896532 aagaagttcccaaaaccactcctagttagagccaagaaaaagcagcctccaccaccagaat 21896591

Query: 58      caggtgagttagggaggggcaagaaggaattgctgaaccacaagtactaacaaaaaagcac 117
            |||
Sbjct: 21896592 caggtgagttagggagggg-caagaaggaattgctgaaccacaagtactaacaaaaaagcac 21896650

Query: 118     tgatgtctcaaacagcatttgaaagcaggaaatgtatgatttgaagtcttcagttcaaga 177
            |||
Sbjct: 21896651 tgatgtctcaaacagcatttgaaagcaggaaatgtatgatttgaagtcttcagttcaaga 21896710

Query: 178     aaatcagctctcttttctaactattatgtttaataataaagaaacagaaacaaaaaaaca 237
            |||
Sbjct: 21896711 aaatcagctctcttttctaactattatgtttaataataaagaaacagaaacaaaaaaaca 21896770

Query: 238     gttaaattggaggtattg 255
            |||
Sbjct: 21896771 gttaaattggaggtattg 21896788

```

Abb. 10a Sequenz des Bandes aus Abb. 5 vom 5' Ende her: Die Suche ergab wie erwartet MLL (Suche mit <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

```

Query: 42      gatccacagctcttacagcgaacacacttggtacagatcttgtaagaagaata----tt 97
            |||
Sbjct: 21904668 gatccacagctcttacagcgaacacacttggtacagatctagaaaagaagaaagaaatt 21904609

Query: 98      ctttaggaatttcttgtttt 117
            | |||
Sbjct: 21904608 caataggaatttcttgtttt 21904589

```

Abb. 10b Sequenz des Bandes aus Abb. 5 vom 3' Ende her: die Suche von dem 3' Ende her gestaltete sich schwieriger, es wurde jedoch auch MLL gefunden. (Suche mit <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Um der technischen Schwierigkeit der Sequenzierung eines langen PCR Produktes entgegenzutreten, wurde die Bande des Panhandle PCR mit den Restriktionsenzymen BamHI, EcoRI, PstI und XbaI geschnitten, in der Absicht, kürzere Banden zu erlangen. In der Abbildung 11 sind die entsprechenden Banden zu sehen. Eine Sequenzierung der Banden ergab jedoch ebenfalls MLL, ein potentieller Partner war nicht zu eruieren.

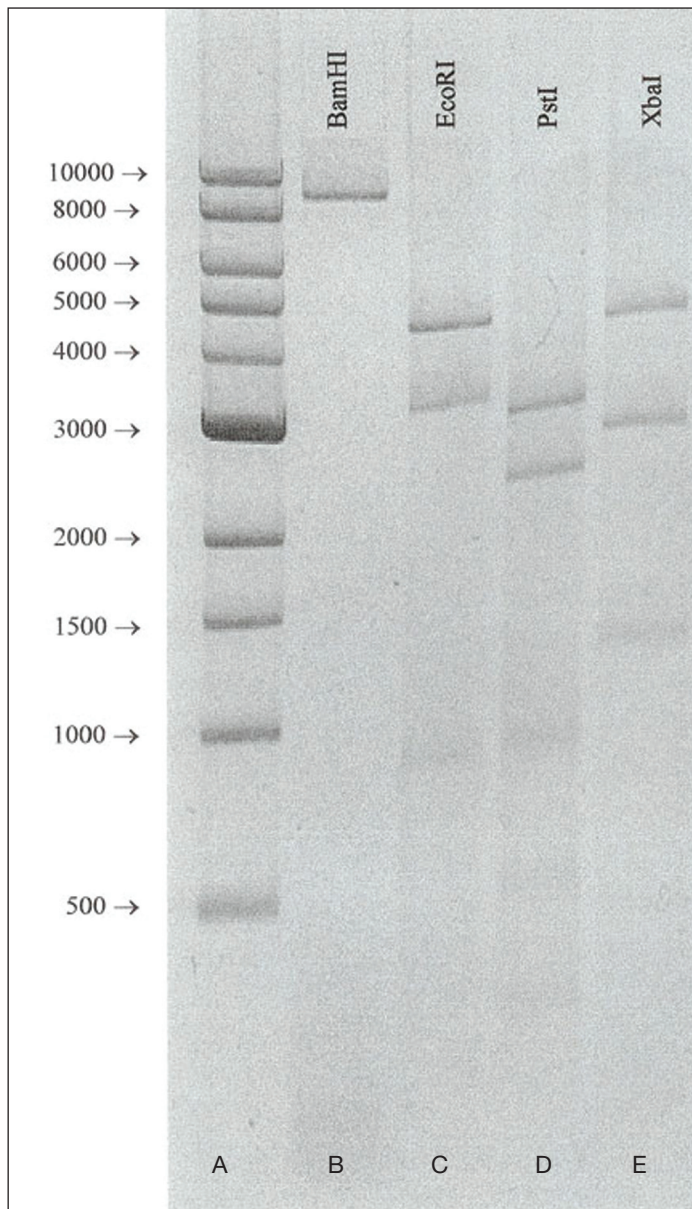


Abb. 11 Verdau der in Abb. 9 unter F erhaltenen Bande von ca. 9-10 Kbp mit den Restriktionsenzymen BamHI (B), EcoRI (C), PstI (D) und XbaI (E). A ist der Marker. Gut zu sehen sind die jeweils durch den Verdau erhaltenen kürzeren Fragmente.

Suche nach dem Partnergen ausgehend von RNA

Um die Gensequenz mit einem anderen methodischen Ansatz zu finden, verwendete ich die RACE Technik mittels eines Kits von Invitrogen (RACE = rapid amplification of cDNA ends; schnelle Amplifikation von cDNA Enden). RACE ist eine Technik, die mRNA als Ausgang verwendet. Die mRNA wird mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in cDNA transkribiert. Als Primer für die Reverse Transkriptase nahm ich den GeneRacerTm Oligo dT Primer aus dem Kit. Somit wurde eine cDNA hergestellt, an der sich am 5' Ende MLL und am 3' Ende die bekannte Sequenz des Oligonukleotid befindet. Anschliessend konnte mit einem PCR begonnen werden, das am 5' Ende den spezifischen MLL Primer 2 und am 3' Ende den auf das Oligonukleotid passenden GeneRacerTm 3' Primer hatte. Nach erfolgreicher Amplifikation wurde zur Erhöhung der Spezifität und Sensitivität ein Nested PCR durchgeführt mit dem MLL Primer 4 für das 5' Ende und dem GeneRacerTm 3' Nested Primer für das 3' Ende.

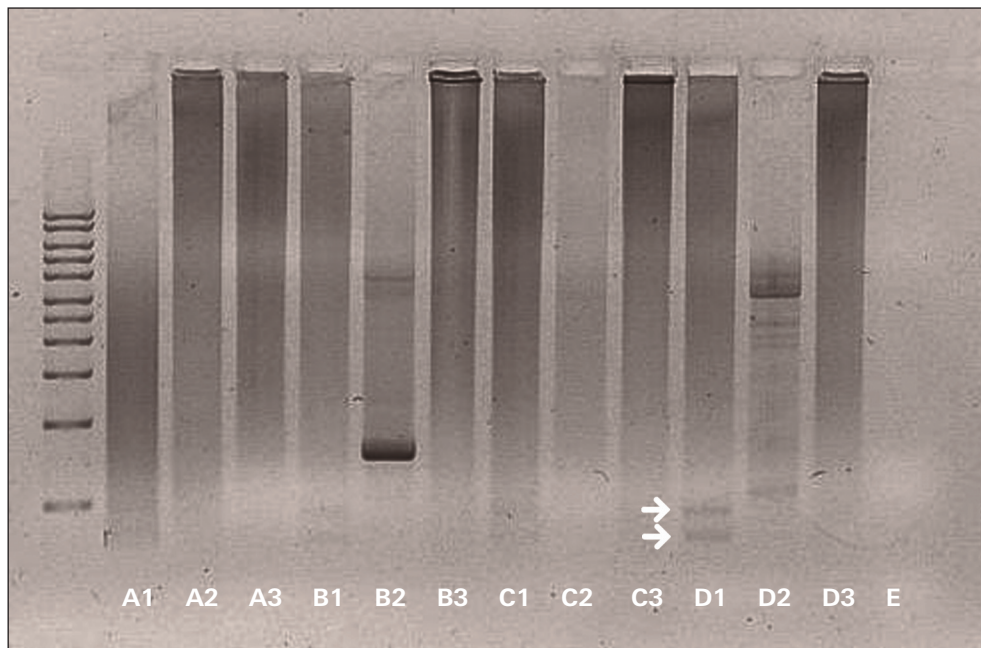


Abb. 12 RACE PCR, als Touchdown-PCR mit einem Gradienten durchgeführt. Bei den einzelnen Reihen A – D wurde immer zuerst beide Primer in den Ansatz getan (1), dann nur der 5' (2), und anschliessend nur der 3' (3), um Produkte, welche mit einem Primer entstehen, auszuschliessen. PCR gemäss der Anleitung im Kap. 4, T_m bei der Reihe A 66° , 63° und 60° ; bei B 67.7° , 64.7° und 61.7° ; bei C 70.2° , 67.2° und 64.2° ; bei D 72° , 69° und 66° . E ist die Negativkontrolle mit beiden Primern ohne DNA. Gut erkennbar sind die beiden Banden in D1 auf 400kb und 300kb, auf gleicher Höhe ebenfalls erkennbar in C1 und schwach in B1. Die übrigen Banden sind nicht spezifisch.

Um die optimale Annealing Temperatur (T_m) herauszufinden, wurde das Touchdown-PCR mit einem Gradienten durchgeführt. In Abbildung 12 ist eine solche Abstufung mit einem Temperaturgradienten zu sehen. Dabei wurden die in D1 gesehenen Banden mit einem Nested PCR amplifiziert mit den entsprechenden T_m 72° , 69° und 66° . Anschliessend wurden die beiden Banden ausgeschnitten, mit GENECLAN gereinigt und mit dem TOPO TA Cloning Kit von Invitrogen kloniert.

Bei der Selektion von den gewachsenen Kolonien, weiterer Kultivierung im Schüttelinkubator bei 37°C über die Nacht und Isolation der Plasmide mit dem Qiagen Plasmid Isolation Kit konnte unter dem UV-Licht anschliessend eine Bande visualisiert werden, die auch schon vor der Klonierung zu sehen war. Diese Bande, zu sehen in der Abbildung 11 in der Reihe F, wurde ausgeschnitten, gereinigt und sequenziert. Dass die Subklonierung erfolgreich war, ist aus der Abbildung 13 zu entnehmen: Die Bande in der Reihe F bei ungefähr 400 kb entspricht der Bande vor der Klonierung, und die Bande bei 4 Kbp entspricht dem verwendeten Vektor. Anschliessend wurde die Bande ausgeschnitten, gereinigt und sequenziert.

Das Resultat der Suche in der genomischen Datenbank nach einer der ausgeschnittenen und sequenzierten Bande entsprechender Gensequenz ist in der Abbildung 14a und 14b zu sehen. Beim 5' Ende war wie zu erwarten mRNA von MLL abzulesen, auf Exon 6, zu sehen in der Abbildung 14a. Jedoch war beim 3' Ende ebenfalls nur mRNA von MLL abzulesen

auf Exon 7, siehe dazu in der Abbildung 14b nach. Ein Partnergen war aber leider nicht auszumachen.

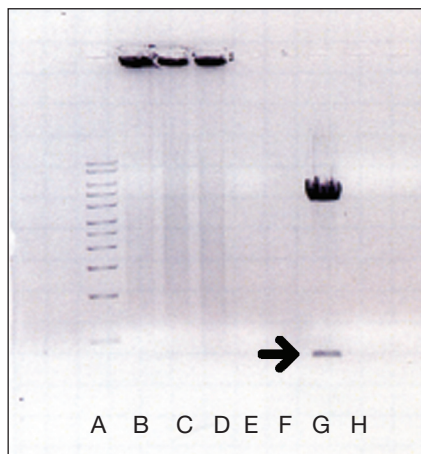


Abb. 13 Gel nach erfolgter Subklonierung. Nur bei F ist eine Kolonie erfolgreich gewachsen, die Bande bei 400 bp stimmt überein mit der zuvor gesichteten Bande in obiger Abbildung. Die Bande bei 4 Kbp entspricht dem Vektor.

```

Query: 1      acgaaagcccgctcgaggaaaagagtgaagaaggg-atgtctcgccctgggcctgaatc 59
             |||
Sbjct: 21896371 acgaaagcccgctcgaggaaaagagtgaagaagggaatgtctcgccctgggcctgaatc 21896430

Query: 60     caaacaggccaccactccagcttccaggaagtcaagcaagctaggtctccagccagcac 119
             |||
Sbjct: 21896431 caaacaggccaccactccagcttccaggaagtcaagcaagc-aggtctccagccagcac 21896489

Query: 120    tggtcatcccgctcagccacctactactggaccgc 155
             |||
Sbjct: 21896490 tggtcatcccgctcagccacctactacaggaccgc 21896525

```

Abb. 14a Sequenzierung des 5' Ende von der Bande in Abb.7. Die Suche ergab wie erwartet mRNA von MLL.

```

Query: 16     acctgattctgggtgggaggtgctttttcttgggctcactaggagtgggttttgggaac 75
             |||
Sbjct: 21896596 acctgattctgggtgggaggtgctttttcttgggctcactaggagtgggttttgggaac 21896537

Query: 76     ttcttttcttggcggtcctgtagtaggtggctgagggcggtgaccagtgctggctggga 135
             |||
Sbjct: 21896536 ttcttttcttggcggtcctgtagtaggtggctgagggcggtgaccagtgctggctggga 21896477

Query: 136    gacctgcttgccttgacttctggaagctggagtggctgcttggattcaggccagg 195
             |||
Sbjct: 21896476 gacctgcttgccttgacttctggaagctggagtggctgcttggattcaggccagg 21896417

Query: 196    g-ccgagacattccattcttctactcttttctcgcg 233
             |||
Sbjct: 21896416 ggccgagacattccc-ttcttctactcttttctcgcg 21896379

```

Abb. 14b Sequenzierung des 3' Ende von der Bande in Abb.7. Die Suche ergab ebenfalls mRNA von MLL, ein Partnergen war auch in dieser Sequenzierung nicht auszumachen.

6. Diskussion

Eine 5-jährige Patientin mit AML (FAB M2) und initialer Translokation t(8;12) entwickelte im Verlaufe ihrer Behandlung mit Chemotherapie eine neue klonale Veränderung im Knochenmark mit einem Karyotyp t(11;11)(q13;q23) trotz morphologischer Remission. Ziel war es, das Partnerchromosom des MLL Gens 11q23 zu identifizieren. Mittels FISH konnte bestätigt werden, dass bei der im Karyogramm von Knochenmarkzellen sichtbaren Translokation t(11;11) das MLL Gen in der Region 11q23 involviert ist und rearrangiert sein muss. Bei der Untersuchung des Partnerbereiches für die MLL-Region konnte mittels FISH Analyse unter Anwendung von BAC Sonden der Bruchpunkt genau in den Bereich 11q13 lokalisiert werden. Somit stellte sich die Hypothese, mit der vorliegenden Translokation t(11;11)(q13;q23) einen neuen unbekannten Fusionspartner für das MLL-Gen gefunden zu haben. Die angewandten Techniken bei der Suche nach dem Partnergen von MLL sind Standard-Techniken zur Lösung des Problems, wie es in dieser Situation vorkommt: Ein unbekanntes Gen fusioniert mit einem bekannten Gen. Nach den Regeln der Fusionen von MLL mit Partnergenen konnte davon ausgegangen werden, dass sich am 5' Ende MLL und am 3' Ende der Fusionspartner befindet.

Die Panhandle-Technik wurde entwickelt, um DNA Abschnitte mit bekanntem 5' Ende und unbekannten 3' Ende zu amplifizieren. Dies hat sich mehrfach bei der Suche nach dem Fusionspartner von MLL bewährt [24]. Es wurde bei der mehrmaligen Durchführung des Panhandle PCR eine Bande zwischen 9 - 10 Kbp gefunden. Die Sequenzierung ergab MLL, ein Partner war nicht zu eruieren. Ebenfalls ist es eine übliche Methode, bei der Suche nach dem unbekannten Partnergen von der RNA Ebene aus zu suchen. Die RACE Technik ist dafür geeignet. Dabei wurde mit anschliessender Subklonierung ebenfalls eine Bande gefunden, deren Sequenzierung jedoch wiederum MLL ergab. Die Versuche, die Bande mit Restriktionsenzymen zu verdauen und somit kürzere Abschnitte zu bekommen, war insofern erfolgreich, als dass kürzere Fragmente hergestellt werden konnten, die Sequenzierung aber nur MLL zeigte. Es wurden auch Versuche durchgeführt, die gesichtete Bande zwischen 9 - 10 Kbp nach dem Prinzip des Nested PCR durch entsprechende Primer zu verkürzen. Nach dem erfolgten Panhandle mit anschliessendem ersten PCR erfolgte das Nested PCR mit anderen Primern: Der 3' Nested Primer blieb der gleiche, der 5' Primer wurde näher zu dem unbekannten Bruchpunkt gesetzt (Primersequenzen von den Exonsequenzen 6, 7, 8, 9, 10 und 11). Auch diese Versuche führten nicht zu den erwarteten Resultaten.

Die Suche nach dem Partnergen hat sich damit schwieriger erwiesen als erwartet. Einerseits ist dies sicherlich durch die Präsenz der Translokation bedingt: In maximal 30-40% der Leukozyten kommt die Translokation vor, jedoch nur haploid. Ebenfalls sind keine Blasten vorhanden, sondern die Hämatopoese läuft normal ab. Dies ist im Gegensatz zu anderen in der Literatur beschriebenen Fällen bei MLL Rearrangements unterschiedlich: Bei Leukämien kommt es durch unkontrollierte klonale Proliferation zu massiver Zellvermehrung. Folglich ist die Translokation in einer grossen Menge an Zellen vorhanden, was wiederum die Suche vereinfacht. Somit könnte auch erklärt werden, warum bei der Suche nach dem Partnergen nur MLL gefunden wurde. Die Chance, den Wildtyp von MLL zu finden ist da-

mit grösser als die fusionierte Gensequenz zu entschlüsseln. Es konnte jedoch bestätigt werden, dass MLL in die Translokation involviert sein muss. Bei den Sequenzierungen der Banden wurde mit den von mir verwendeten Methoden nur MLL gefunden, eine Sequenz eines möglichen Partnergenes war nicht auszumachen.

Dass die gefundene Bande zwischen 9-10 Kbp Länge beträgt, ist ein weiterer erschwerender Faktor: Für PCR ist dies eine beachtliche Länge, und der Sequenzierung sind Grenzen gesetzt: Maximal 750 Basen können am Stück abgelesen werden.

Einige Zeit nach Abschluss meiner praktischen Arbeit wurde in Kooperation mit Prof. Dr. Rolf Marschalek, Institut für pharmazeutische Biologie der Universität Frankfurt, die Gensequenz dieser neuen Translokation ermittelt. Dabei wurde eine neue Klonierungsstrategie, welche auf einem Fragmentlängenpolymorphismus mit Restriktionsenzymen beruht, angewendet. Das neue Partnergen des MLL-Rearrangements, ARHGEF17, konnte damit identifiziert werden. Dieses neue Partnergen liegt auf 11q13. ARHGEF 17 gehört zu der Gruppe der Rho Guanidine Exchange Factors, die Proteine darstellen, welche in der Transkription eine bedeutende Rolle spielen. Die Lokalisation von ARHGEF 17 auf MLL bei 72700 stimmt mit dem Bruchpunkt überein, welcher durch FISH Analysen mit Hilfe von BAC Klonen ermittelt wurde: Mit RP11-300I6 bei 69400 und mit RP11-465I15 bei 72900 liegt ARHGEF 17 dazwischen. Somit konnte eindeutig demonstriert werden, dass das gefundene Gen tatsächlich dem gesuchten entspricht und einen neuen, vorher nicht beschriebenen Partner des MLL-Rearrangement darstellt. Die Hypothese eines neuen Fusionspartners für das MLL Gen konnte damit klar bestätigt werden.

Weiterhin ungeklärt bleibt die Bedeutung der vorliegenden Translokation. Bei ursprünglichen 30-40% der betroffenen Zellen war die Translokation im Herbst 2004 bei lediglich 10 % der Zellen zytogenetisch ersichtlich. Auch nach Therapieende befindet sich die Patientin 4 Jahre nach Diagnosestellung noch immer in anhaltender Remission, und ihr Knochenmark ist morphologisch unauffällig. Eine Spekulation ist, dass diese zytogenetische Veränderung ein möglicher Anhaltspunkt für eine eventuell kommende Sekundärleukämie darstellen könnte. Die Translokation ist jedoch seit mehr als anderthalb Jahren beständig, ohne dass sich irgendwelche Anzeichen für eine Sekundärleukämie gezeigt haben. Ebenfalls wissen wir nichts über die Expression eines möglichen Produktes. Weder die MLL-ARHGEF17 Genfusion noch die ARHGEF17-MLL Genfusion resultierten bisher in einer onkogenen Dysregulation mit Zellwachstum. Vielmehr ist die Zahl der Zellen mit der Translokation seit Beginn tendenziell rückläufig. Erst die weitere Beobachtung dieser klonalen Chromosomenveränderung nach Therapie einer AML wird uns Sicherheit über die Auswirkungen einer solch ungewohnten Translokation geben.

7. Literaturverzeichnis

- 1 NCI monograph, Cancer Incidence and Survival among Children and Adolescents: United States SEER Program, 1975-1995; <http://seer.cancer.gov/publications/childhood/>
- 2 Ravindranath Yaddanapudi. Recent advances in pediatric acute lymphoblastic and myeloid leukemia. *Curr Opin Oncol* 2003; 15: 23-35.
- 3 Rabbits TH. Chromosomal translocations in human cancer. *Nature* 1994; 372: 143-149.
- 4 Creutzig U, Ritter J, Zimmermann M, Reinhardt D, Hermann J, Berthold F, Henze G, Jurgens H, Kabisch H, Havers W, Reiter A, Kluba U, Niggli F, Gadner H. Improved treatment results in high-risk pediatric acute myeloid leukemia patients after intensification with high-dose cytarabine and mitoxantrone: results of Study Acute Myeloid Leukemia-Berlin-Frankfurt-Munster 93. *J Clin Oncol* 2001;19: 2705-13.
- 5 Rabbits TH. Perspective: Chromosomal translocations can affect genes controlling gene expression and differentiation – why are these functions targeted? *Journal of pathology* 1999; 187: 39-42.
- 6 Rowley JD. Rearrangements involving chromosome band 11q23 in acute leukemia. *Seminars in cancer Biology* 1993; 4: 377-385.
- 7 Tkachuk DC, Kohler S, Cleary ML. Involvement of a homolog of *Drosophila trithorax* by 11q23 chromosomal translocations in acute leukemias. *Cell* 1992; 71: 691-700.
- 8 Ziemer-van der Poel S, McCabe NR, Gill HJ, Espinosa R, III, Patel Y, Harden A, Rubinelli P, Smith SD, LeBeau MM, Rowley JD, Diaz MO. Identification of a gene, MLL, that spans the breakpoint in 11q23 translocations associated with human leukemias. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 1991; 88:10735-10739.
- 9 Thirman MJ, Gill HJ, Burnett RC, Mbangkollo D, McCabe NR, Kobayashi H, Ziemer-van der Poel S, Kaneko Y, Morgan R, Sandberg AA, et al. Rearrangement of the MLL gene in acute lymphoblastic and acute myeloid leukemias with 11q23 chromosomal translocations. *N Engl J Med* 1993; 329: 909-914.
- 10 Rowley JD. The critical role of chromosome translocations in human leukemias. *Annu. Rev. Genet.* 1998; 32: 495-519.
- 11 Heerema NA, Arthur DC, Sather H, Albo V, Feusner J, Lange BJ, Steinherz PG, Zeltzer P, Hammond D, Reaman GH. Cytogenetic features of infants less than 12 months of age at diagnosis of acute lymphoblastic leukemia: impact of the 11q23 breakpoint on outcome: a report of the Childrens Cancer Group. *Blood* 1994; 83: 2274-84.
- 12 Super HJ, McCabe NR, Thirman MJ, Larson RA, Le Beau MM, Pedersen-Bjergaard J, Philip P, Diaz MO, Rowley JD. Rearrangements of the MLL gene in therapy-related acute myeloid leukemia in patients previously treated with agents targeting DNA-topoisomerase II. *Blood* 1993, 83: 3705-3711.
- 13 Felix CA. Secondary leukemias induced by topoisomerase-targeted drugs. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1400: 233-255.
- 14 Huret JL. 11q23 rearrangements in leukemia. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol* 2001. <http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer/Anomalies/11q23ID1030>.

html

- 15 Drexler HG, Quentmeier H, MacLeod RAF. Malignant hematopoietic cell lines: in vitro models for the study of MLL gene alterations. *Leukemia* 2004; 18: 227-32.
- 16 Ayton PM, Cleary ML. Molecular mechanisms of leukemogenesis mediated by MLL fusion proteins. *Oncogene* 2001; 20: 5695-5707.
- 17 Zeisig BB, Schreiner S, Garcia-Cu  llar M-P and Slany RK. Transcriptional activation is a key function encoded by MLL fusion partners. *Leukemia* 2003; 17: 359-365.
- 18 Hilden JM, Kersey JH. The MLL (11q23) and AF-4 (4q21) genes disrupted in t(4;11) acute leukemia: molecular and clinical studies. *Leukemia Lymphoma* 1994; 14: 189-195.
- 19 Brady HJ. Apoptosis and leukaemia. *Br J Haematol* 2003; 123: 577-585.
- 20 Schichman SA, Caligiuri MA, Gu Y, Strout MP, Canaani E, Bloomfield CD, Croce CM. ALL-1 partial duplication in acute leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 6236-6239.
- 21 Marschalek R, Nilson I, Lochner K, Greim R, Siegler G, Greil J, Beck JD, Fey GH. The structure of the human ALL-1/MLL/HRX gene. *Leuk Lymphoma* 1997; 27: 417-28.
- 22 Rasio D, Schichman SA, Negrini M, Canaani E, Croce CM. Complete exon structure of the ALL1 gene. *Cancer Res.* 1996; 56: 1766-1769.
- 23 Collins EC, Rabbitts TH. The promiscuous MLL gene links chromosomal translocations to cellular differentiation and tumour tropism. *Trends Mol Med* 2002; 8: 436-442.
- 24 Dimartino JF, Cleary ML. MLL rearrangements in haematological malignancies: lessons from clinical and biological studies. *Br J Haematol* 1999; 106: 614-626.
- 25 Felix CA and Jones DH. Panhandle PCR: a technical advance to amplify MLL genomic translocation breakpoints. *Leukemia* 1998; 12: 976-981.
- 26 Butler LH, Slany R, Cui X, Cleary ML, Mason DY. The HRX proto-oncogene product is widely expressed in human tissues and localizes to nuclear structures. *Blood* 1997, 89: 3361-3370.
- 27 Ingham PW. Trithorax and the regulation of homeotic gene expression in *Drosophila*. A historical perspective. *Int J Dev Biol* 1998; 42: 423-429.
- 28 Ernst P, Wang J, Korsmeyer SJ. The role of MLL in hematopoiesis and leukemia. *Curr Opin Hematol* 2002; 9: 282-287.
- 29 Srissel-Broecker PL, Gill-super HJ, Thirman MJ, Yonebayashi Y et al. Distribution of 11q23 breakpoints within the MLL breakpoint cluster region in de novo acute leukemia and in treatment-related acute myeloid leukemia: correlation with scaffold attachment regions and topoisomerase II consensus binding sites. *Blood* 1996, 87: 1912-1992.
- 30 Eguchi M, Eguchi-Ishimae M, Greaves M. The role of the MLL gene in infant leukemia. *Int J Hematol* 2003; 78: 390-401.
- 31 Pui CH, Gaynon PS, Boyett JM, et al. Outcome of treatment in childhood acute lymphoblastic leukemia with rearrangements of the 11q23 chromosomal region. *Lancet* 2002, 359: 1909-1915.
- 32 Yeoh EJ, Ross ME, Shurtleff SA, Williams WK, Patel D, Mahfouz R et al. Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic

- leukemia by gene expresssion profiling. *Cancer Cell* 2002, 1: 133-143.
- 33 Okutsu J, Tsunoda T, Kaneta Y, Katagiri T, Kitahara O, Zembutsu H et al. Prediction of chemosensitivity for patients with acute myeloid leukemia, according to expression levels of 28 genes selected by genome-wide complementary DNA microarray analysis. *Mol Cancer Ther* 2002, 1: 1035-1042.

8. Verdankungen

Mein Dank richtet sich an Herrn Prof. Dr. sc. nat. B. Schäfer und Herrn Prof. Dr. med. F. Niggli, unter deren Leitung die vorliegende Arbeit zustande gekommen ist und für ihre gute Betreuung. Ganz speziellen Dank richte ich an Herrn David Betts für die Durchführung der FISH und Karyogramme sowie Herrn André Fitsche, der ihn dabei unterstützt hat. Dem ganzen Team des onkologischen Diagnostiklabors, des onkologischen Forschungslabors des Kinderspitals Zürich, insbesondere Herrn Dr. sc. nat. M. Wachtel, aber auch den Mitarbeitern der klinischen Chemie danke ich für die zahlreichen Tipps und die technische Unterstützung. Sie alle haben mich bei meinem Projekt mit Ratschlägen zur technischen Durchführung unterstützt.

9. Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name	Eberle
Vorname	Dominique Gilbert Basil
geboren	5. Juli 1979 in Winterthur
Heimatort	Nürens Dorf, ZH

Besuchte Schulen

1986 - 1992	Primarschule in Adelboden, BE und Nürens Dorf, ZH
1992 - 1999	Kantonsschule Rychenberg, Winterthur, ZH, Typus B

Studium der Humanmedizin

1999 - 2005	Medizinstudium an der Universität Zürich
11/2005	Staatsexamen an der Universität Zürich

Weiterbildung nach dem Studium

2006 - 2007	Assistenzarzt Anästhesie, Kantonsspital Winterthur
2007 - 2009	Assistenzarzt Ospidal Scuol, Innere Medizin und Chirurgie